



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Physik

Analyse von schnellen dynamischen Prozessen und Proteininteraktionen nach dicht ionisierender Bestrahlung

Vom Fachbereich Physik
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von
Dipl. Biophys. Frank Tobias
aus Aschaffenburg

Darmstadt 2012
D17

Referent: Prof. Marco Durante, Ph.D.
Korreferent: Prof. Dr. Dr. h. c. Gerhard Kraft

Tag der Einreichung: 21.11.2011
Tag der Prüfung: 13.02.2012

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Dynamik und die Bindungseigenschaften von DNA-Reparaturproteinen in der Reaktion lebender humaner Zellen auf strahleninduzierte DNA-Schäden zu untersuchen. Insbesondere sollte der Einfluss der hohen DNA-Schadensdichte nach Schwerionenbestrahlung analysiert werden. Mittels verschiedener Mikroskopietechniken wurde die Geschwindigkeit der Akkumulation und der Austausch der DNA Reparaturproteine NBS1, MDC1, ATM, ATR und 53BP1 in strahleninduzierten Foci ermittelt. Durch kinetische Modellierungen konnten Bindungsparameter bestimmt werden. Untersuchungen in unbestrahlten Zellen zeigten für alle Proteine im Zellkern eine unterschiedliche und gleichzeitig deutlich geringere Mobilität, als gemäß reinem Diffusionsverhalten zu erwarten gewesen wäre. Alle Proteine zeigten außerdem eine funktionsabhängige Rekrutierungskinetik. 53BP1 bindet schadensdichteunabhängig an das Chromatin um den DNA Schaden. Hierbei bildet die Gesamtproteinmenge den kinetisch limitierenden Faktor. NBS1 bindet in zwei Fraktionen an den DNA-Schaden, wobei mit steigender Schadensdichte der fest bindende Anteil zunimmt. Auch das Protein ATR bindet vermehrt bei einer hohen Schadensdichte. Die stark konzentrierte und komplexe DNA-Schädigung nach Schwerionenbestrahlung und die vermehrte feste Bindung von NBS1 führen vermutlich zu einer erhöhten Proteinaktivierung. Dadurch werden im umliegenden Chromatin beschleunigt Bindungsstellen gebildet, was in einer schnelleren Akkumulation von MDC1 zusammen mit NBS1 resultiert. Eine sehr hohe Schadensdichte führt außerdem dazu, dass MDC1 nicht nur direkt um den DNA Schaden, sondern auch an das Chromatin im gesamten Zellkern bindet. Diese Ergebnisse zeugen von einer veränderten Zellreaktion nach Bestrahlung mit Schwerionen und verdeutlichen die besondere biologische Wirkung der Schwerionenbestrahlung.

Im zweiten Projekt sollte ein experimenteller Aufbau entwickelt werden, der es ermöglicht die Interaktion von Molekülen in lebenden Zellen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung zu messen. Dieser Aufbau soll in Zukunft dazu dienen, das komplexe molekulare Netzwerk der zellulären Antwort auf DNA-Schäden besser erforschen zu können. Hierzu wurde die fluoreszenz-polarisationsbasierte FRET Messmethode erstmals mit konfokaler Spinning-Disk Mikroskopie kombiniert. Durch einen modularen Aufbau ist das System auch weiterhin als konfokales Fluoreszenzmikroskop verwendbar. Das FRET System wurde mit blau/gelb und rot/grün fluoreszierenden Referenzstandards validiert und in ersten biologischen Anwendungen getestet.

Abstract

The aim of this project was to analyze the dynamics and binding characteristics of DNA repair proteins during the response of living human cells to radiation-induced DNA damage. In particular, the impact of dense DNA damage after charged particle irradiation was investigated. Different microscopic techniques were used to determine the accumulation kinetics and exchange rates of the repair proteins NBS1, MDC1, ATM, ATR and 53BP1 in irradiation-induced foci. By applying kinetic models, binding constants could be identified. In unirradiated cells, all proteins behaved differently and were less mobile than expected from pure diffusion. Furthermore, all proteins showed function-dependent accumulation kinetics. Binding of 53BP1 to the chromatin surrounding the DNA damage is independent of the damage density. The amount of protein is the kinetically limiting factor. NBS1 binds in two distinct fractions to the damaged DNA in which the tight binding fraction grows with increasing DNA damage density. The amount of ATR which binds to the damaged DNA also increases with the damage density. The highly concentrated and complex DNA damage after charged particle irradiation together with the increased tight binding fraction of NBS1 presumably results in stronger protein activation. Consequently, the creation of binding sites in the damaged area surrounding chromatin is accelerated and MDC1 together with NBS1 is recruited faster. A high damage density also results in the binding of MDC1 not only to the chromatin in the damaged area but also throughout the entire cell nucleus. These results are evidence of an altered cellular response after irradiation with charged particles and point out the specific biological effects of charged particle irradiation.

In a second project, an experimental setup was designed that makes it possible to measure molecular interactions in living cells with high spatial and temporal resolution. This setup will provide insights in the complex molecular network within cells after DNA damage induction. The fluorescence polarization-based FRET method was combined with a spinning disk confocal microscope for the first time. Through a modular design, the system still provides a conventional setup for confocal fluorescence microscopy. The FRET system was validated with blue/yellow and green/red fluorescence reference standards and was used in preliminary biological experiments.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Abstract	V
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVII
1 Einführung	1
1.1 Biologische Grundlagen der zellulären Reaktion auf DNA-Strahlenschäden	1
1.1.1 Aufbau des Zellkerns und des Chromatins	1
1.1.2 Zelluläre Reaktion auf DNA-Schäden	2
1.2 Physikalische Grundlagen der Schwerionenbestrahlung und deren besondere Wirkung	7
1.3 FRAP, eine Methode zur Analyse des dynamischen Verhaltens von fluoreszenzmarkierten Proteinen	13
1.4 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), eine Methode zur Analyse von Proteininteraktionen	14
1.4.1 Grundlegende Prinzipien des Förster-Resonanzenergietransfers	14
1.4.2 Methoden zur Detektion des Förster-Resonanzenergietransfers	18
1.4.3 Fluoreszenzpolarisationsanisotropie	20
1.4.4 homo-FRET	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Kultivierung und Behandlung der Zellen	23
2.1.1 Zelllinien	23
2.1.2 Zellaussaat	24
2.1.3 Transfektion der Zellen	25
2.1.4 Fixierung der Zellen	26
2.1.5 Immunzytochemische Färbung der Zellen	26
2.1.6 Inhibitorbehandlung der Zellen	28
2.2 Zellbestrahlung	28
2.2.1 Röntgenbestrahlung	28
2.2.2 Ionenbestrahlung am UNILAC der GSI	29

2.2.3	Ionenbestrahlung am Microbeamaufbau der GSI	30
2.3	Mikroskopie	30
2.3.1	Strahlplatz-Mikroskop	30
2.3.2	FRAP-Mikroskopie	30
2.3.3	FRET-Mikroskopie	31
2.3.4	Mikroskopie der immunzytochemisch gefärbten Zellen	31
2.4	Datenanalyse und Bildbearbeitung	31
2.4.1	Fitten der FRAP Daten	31
2.4.2	Bildbearbeitung	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Akkumulation von DNA Reparaturproteinen in strahlungsinduzierten Foci	33
3.1.1	Kinetik der Foci-Bildung verschiedener Proteine nach Ionenbestrahlung	33
3.1.2	Abhängigkeit der Rekrutierungskinetik von der Schadensdichte	35
3.2	Analyse der Reparaturproteindynamik in lebenden Zellen	38
3.2.1	Einführung und Charakterisierung des FRAP Aufbaus	38
3.2.2	Freie Diffusion im Nukleoplasma	41
3.2.3	Reparaturproteindynamik in lebenden humanen Zellen	42
3.2.4	Dynamisches Austauschverhalten der Reparaturproteine am DNA-Schaden nach Röntgenbestrahlung	43
3.2.5	Modellierung der FRAP Kurven	43
3.2.6	Analyse des dynamischen Verhaltens von NBS1, MDC1, 53BP1 und ATR im Zellkern nach Röntgen- und Schwerionenbestrahlung	48
3.3	Etablierung eines Versuchsaufbaus zur Analyse von Proteininteraktionen mittels FRET-Mikroskopie	70
3.3.1	Wahl der FRET-Messmethode	70
3.3.2	Planung und Aufbau eines polarisationsanisotropiebasierten FRET Messplatzes	70
3.3.3	Charakterisierung des polarisationsanisotropiebasierten FRET Messplatzes	74
3.3.4	Bestimmung der Polarisationsanisotropie und des G-Faktors	76
3.4	FRET-Lebendzellmessungen mit Referenzstandards	78
3.4.1	FRET zwischen blau und gelb fluoreszierenden Proteinen in lebenden Zellen	78
3.4.2	FRET zwischen grün und rot fluoreszierenden Proteinen in lebenden Zellen	80
3.4.3	Einfluss verschiedener Objektive auf die Polarisationsanisotropiemessungen	81
3.5	Nicht konfokale FRET Fluoreszenzpolarisationsanisotropiemessung	82
3.6	Experimentelle Anwendungen der polarisationsanisotropiebasierten FRET Messtechnik	84
3.6.1	Experimente zur Bestimmung der Chromatinkondensation	84
3.6.2	homoFRET Messungen von 53BP1 nach Au-Ionenbestrahlung	85
3.7	FRET Detektion durch Akzeptorbleichen	86
4	Diskussion	89
4.1	Dynamisches Verhalten der Proteine in unbestrahlten Zellen	89
4.1.1	Reines Diffusionsverhalten	89
4.1.2	Mobilität der Reparaturproteine ATR, NBS1, MDC1 und 53BP1 in unbestrahlten Zellen	92
4.2	Vergleich der verschiedenen FRAP-Modelle sowie experimentelle Einschränkungen	98

4.3	Dynamisches Verhalten der Reparaturproteine nach DNA-Schadensinduktion . .	104
4.3.1	Dynamisches Verhalten von NBS1 und MDC1 nach DNA-Schadensinduktion	104
4.3.2	Dynamisches Verhalten von 53BP1 nach DNA-Schadensinduktion	111
4.3.3	Dynamisches Verhalten von ATR nach DNA-Schadensinduktion	114
4.4	Der experimentelle Aufbau zur FRET-Detektion mittels Fluoreszenzpolarisations- anisotropie	117
4.5	Validierung des Messplatzes für Lebendzellmessungen mit FRET-Referenzstandards	118
4.6	Anwendungen der FRET-Messmethode auf biologische Fragestellungen	120
5	Ausblick	123
A	Anhang	125
A.1	Spektren der optischen Komponenten im FRET-Aufbau	126
	Literaturverzeichnis	131
	Lebenslauf	149
	Danksagung	151
	Erklärung	153

Abbildungsverzeichnis

1.1	Eukaryotische Zelle und der Aufbau des Chromatins	2
1.2	DNA und ihre Bausteine	3
1.3	Struktur des MRN-Komplexes am DSB	5
1.4	Modell der Signalkaskade und Proteinrekrutierung am DSB	6
1.5	Rekrutierung und Funktion von ATR am DSB	7
1.6	Tiefendosis-Profil von Photonen und Ionen	9
1.7	Zellüberleben bei Photonen- und Ionenbestrahlung	10
1.8	Dosis, Zellüberleben und RBW in Abhängigkeit von der Eindringtiefe in ein Wasserphantom, bei Bestrahlung mit Kohlenstoffionen mit einer Energie von 270 MeV/u	11
1.9	Dosisverteilung nach Photonen- und Kohlenstoffionen-Bestrahlung	12
1.10	Radiales Dosisprofil von O-Ionen mit einer Energie von 2,57 MeV/u in Wasserdampf	12
1.11	Schematische Darstellung des FRAP-Messprinzips	14
1.12	Jablonski Diagramme mit möglichen Übergängen	15
1.13	Schematische Darstellung der Winkel α , β und γ zur Berechnung des Orientierungsfaktors κ nach Formel 1.13	16
1.14	Spektraler Überlapp des Donoremissions- mit dem Akzeptorabsorptionsspektrum	16
1.15	Prinzip der FRET Messung über Polarisationsanisotropie	20
2.1	Zellbestrahlung am UNILAC der GSI	29
3.1	Messung mit dem Strahlplatz-Mikroskop von 53BP1-GFP bei Bestrahlung mit Au-Ionen	34
3.2	Rekrutierung von Reparaturproteinen nach Ionenbestrahlung	34
3.3	Abhängigkeit der NBS1 Rekrutierung von der Schadensdichte	35
3.4	Rekrutierung von NBS1 nach Microbeam-Bestrahlung	36
3.5	Rekrutierung von MDC1 nach Ionenbestrahlung	36
3.6	Rekrutierung von 53BP1 nach C- und Au- Ionenbestrahlung	37
3.7	ATR-Rekrutierung nach C- und Au-Ionenbestrahlung	38
3.8	Aufbau des FRAP Messplatzes	39
3.9	Geometrie des gebleichten Bereichs	40
3.10	Bilder aus einer FRAP-Zeitserie	41
3.11	FRAP Messungen von freiem GFP im Nukleoplasma humaner U2OS Zellen . . .	42
3.12	Reparaturproteindynamik im Zellkern lebender humaner Zellen	42
3.13	FRAP Messungen in strahlungsinduzierten Foci in U2OS Zellen nach Röntgenbestrahlung	43
3.14	Reaktions- und Diffusionsfit von NBS1-GFP in unbestrahlten U2OS Zellen . . .	49

3.15	NBS1 Dynamik nach DNA-Schadensinduktion	50
3.16	NBS1 Dynamik in Foci nach Ar-Ionenbestrahlung mit und ohne CK2-Inhibition	50
3.17	Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell von NBS1-GFP in U2OS Zellen nach U-Ionen- und Röntgenbestrahlung	51
3.18	Fitparameter des Diffusions-Reaktionsmodells in Abhängigkeit des LET	52
3.19	Immunfluoreszenzfärbung von NBS1 und MDC1 nach Au-Ionenbestrahlung mit und ohne CK2-Inhibitor	53
3.20	Fit der Messung nach U-Ionenbestrahlung mit festgelegtem $V_{Zelle,Foci}$	54
3.21	Einfluss der Messdatenlänge auf das Fitergebnis	55
3.22	FRAP Messungen von MDC1-GFP in unbestrahlten U2OS-Zellen mit Diffusionsfit	56
3.23	MDC1-GFP Dynamik in U2OS Zellen nach DNA-Schadensinduktion mit Röntgen- und Ionenbestrahlung	57
3.24	Fits der in Abbildung 3.23 gezeigten Messungen mit dem Diffusions-Reaktionsmodell	58
3.25	Fit der in Abbildung 3.23 gezeigten Messung nach Au-Ionenbestrahlung, nicht in Foci, mit dem Diffusionsmodell und dem Diffusionsmodell mit einer Bindung	59
3.26	MDC1-GFP FRAP-Messungen in U2OS-Zellen nach Ionenbestrahlung ohne und mit CK2-Inhibition oder ATM- und DNA-PK Doppelinhibition	60
3.27	Fits der in Abbildung 3.26 gezeigten Messungen nach Au-Ionenbestrahlung ohne und mit ATM und DNA-PK Inhibition	61
3.28	Immunfluoreszenzfärbung von MDC1 und γ H2AX nach Au-Ionenbestrahlung ohne und mit ATM- und DNA-PK-Doppelinhibition	62
3.29	Immunfluoreszenzfärbung von MDC1 und γ H2AX nach 2 Gy Röntgenbestrahlung ohne und mit ATM- und DNA-PK-Doppelinhibition	62
3.30	Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell der in Abbildung 3.26 gezeigten Messungen nach Ar-Ionenbestrahlung ohne und mit CK2 Inhibition	63
3.31	53BP1-GFP Mobilität in unbestrahlten U2OS Zellen mit Diffusionsfit	64
3.32	53BP1-GFP Dynamik in U2OS Zellen nach DNA-Schadensinduktion mit Röntgen- und Ionenbestrahlung	64
3.33	Fits der in Abbildung 3.32 gezeigten Messungen in Foci mit dem Diffusions-Reaktionsmodell	66
3.34	Korrelation zwischen der mittleren Fluoreszenzintensität im gesamten Zellkern und in den Foci	67
3.35	Dynamik von ATR-GFP in U2OS Zellen	68
3.36	Ergebnisse mit dem Diffusions-Reaktionsmodell und D_{1eff} als zusätzlichen freien Fitparameter	69
3.37	Schematische Darstellung des Mikroskops vor der FRET-Erweiterung	71
3.38	Anbringen des Polarisators in der konfokalen Spinning-Disk-Einheit	72
3.39	Polarisationsstrahlteiler im Emissionsstrahlengang in Aufsicht dargestellt	73
3.40	Kompletter experimenteller Aufbau für polarisationsanisotropiebasierte FRET-Messungen	73
3.41	Polarisation des Laseranregungslichts	75
3.42	Polarisation der Emission	75
3.43	G-Faktor Bestimmung	76
3.44	Abhängigkeit der Transmission im Emissionsstrahlengang von der Polarisationsausrichtung	77
3.45	Messungen der Fluoreszenz und deren Polarisationsanisotropie von blau/gelben FRET-Konstrukten in U2OS Zellen	79

3.46	Messungen der Fluoreszenz und deren Polarisationsanisotropie von grün/roten FRET-Konstrukten in U2OS Zellen	80
3.47	Einfluss verschiedener Objektive auf die Polarisationsanisotropie der blauen Cerulean Fluoreszenz in U2OS Zellen bei polarisierter 405 nm Anregung	82
3.48	Schematischer Aufbau für die nicht konfokale FRET Methode und Polarisation der Epi-Fluoreszenzanregung	83
3.49	Polarisationsanisotropie mit der nicht konfokalen Messmethode für blau/gelb fluoreszierende FRET Konstrukte	83
3.50	Polarisationsanisotropie mit der nicht konfokalen Messmethode für grün/rot fluoreszierende FRET Konstrukte	84
3.51	FRET Messung von Hela Zellen stabil transfiziert mit H2B-GFP und H2B-mCherry	85
3.52	FRET Analyse von U2OS Zellen stabil transfiziert mit 53BP1-GFP nach A-Ionenbestrahlung	86
3.53	Messung von FRET durch Akzeptorbleichen	87
4.1	Theoretische Abhängigkeit der Diffusionskonstante von der Proteinmasse	92
4.2	MRN- und MDC1-Focibildung am DSB	104
4.3	Abhängigkeit der Produktbildung (γ H2AX) von der Katalysatormenge (ATM) .	106
4.4	FRAP-Kurvenverlauf nach dem Diffusions-Reaktionsmodell für verschiedene Werte für k_{2on}^* . Menge des in Foci gebundenen Proteins bei unterschiedlicher Gesamtproteinmenge	113
A.1	Spektrale Eigenschaften des 3-Farben dichroitischen Spiegels Di01-405/488/561 von Semrock für die s- und p-Polarisation	126
A.2	Spektrale Eigenschaften des 4-Farben dichroitischen Spiegels Di01-T405/488/568/647 von Semrock für die s- und p-Polarisation	126
A.3	Spektrale Eigenschaften des Polarisators	127
A.4	Spektrale Eigenschaften des Polarisationsstrahlteilers	127
A.5	Spektrale Eigenschaften der blau (CFP) und gelb (YFP) fluoreszierenden Proteine und der entsprechenden optischen Komponenten bei konfokalen FRET Messungen	128
A.6	Spektrale Eigenschaften der blau (CFP) und gelb (YFP) fluoreszierenden Proteine und der entsprechenden optischen Komponenten bei nicht konfokalen FRET Messungen	128
A.7	Spektrale Eigenschaften der grün (GFP) und rot (mCherry) fluoreszierenden Proteine und der entsprechenden optischen Komponenten bei konfokalen FRET Messungen	129
A.8	Spektrale Eigenschaften der grün (GFP) und rot (mCherry) fluoreszierenden Proteine und der entsprechenden optischen Komponenten bei nicht konfokalen FRET Messungen	129

Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht der verwendeten primären Antikörper	27
2.2	Übersicht der verwendeten sekundären Antikörper	27
3.1	Ergebnisse der Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell	52
3.2	NBS1-Bindungskonstanten aus den in Abbildung 3.21 gezeigten Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell	54
3.3	Fitergebnisse der Messungen in Foci aus Abbildungen 3.24, 3.27a, 3.27b und 3.30 mit dem Diffusions-Reaktionsmodell	58
3.4	Fitergebnisse der Messungen nicht in Foci aus Abbildungen 3.25b, 3.27c und 3.27d mit dem Diffusionsmodell mit einer Bindung	59
3.5	Fitergebnisse aus Abbildung 3.33	65
3.6	Ergebnisse für k_{2on}^* und k_{2off} der in Abbildung 3.35 gezeigten Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell	68
3.7	Ergebnisse der in Abbildung 3.36 gezeigten Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell und D_{1eff} als zusätzlichen freien Fitparameter	69
4.1	Theoretische freie Diffusion und gemessene effektive Diffusion der untersuchten Proteine	93
4.2	Modelle zur Beschreibung der Proteinmobilität	98

Abkürzungsverzeichnis

γ H2AX	Am Serin 139 phosphorylierte Histonvariante H2AX
Å	Angström
53BP1	p53 binding protein
9-1-1	RAD9-HUS1-RAD1
AOTF	Acousto-optic tunable filter
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related Protein
ATRIP	ATR-interacting protein
BED	Biologisch Effektive Dosis
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCT	BRCA1 C Terminus
BSA	Rinderserumalbumin
C5A	Cerulean verbunden über fünf Aminosäuren mit Amber
C5V	Cerulean verbunden über fünf Aminosäuren mit Venus
CFP	Cyan fluorescent protein
CHK1	Checkpoint kinase 1
CHO	Chinesische Hamster Ovarien Zellen
CK2	Casein Kinase 2
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DSB	Doppelstrangbruch
EM-CCD	Electron-multiplying charge-coupled device
FHA	Forkhead-associated
FRAP	Fluorescence Recovery after Photobleaching
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FWHM	Full Width at Half Maximum
GFP	Green fluorescent protein
GSI	GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH

H2AX	Variante X des Histons H2A
H3	Histon 3
H3K79me	Am Serin 79 methyliertes Histon 3
H3K9me3	Am Lysin 9 trimethyliertes Histon 3
H4	Histon 4
HERC2	Hect domain and RLD 2
homo-FRET	FRET zwischen zwei gleichartigen Chromophoren
HP1	Heterochromatin-Protein 1
HR	Homologe Rekombination
IC	Interne Konversion
IRIF	Ionizing radiation induced foci
ISC	Interkombination
KU55933	2-Morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one
LET	Linearer Energietransfer
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MRE11	Meiotic recombination 11
MRN	Proteinkomplex bestehend aus MRE11, Rad50 und NBS1
N.A.	Numerische Apertur
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrom 1
NHEJ	Nicht Homologe Endverknüpfung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pByffu	GFP und mCherry über 13 Aminosäuren miteinander verbunden
PFA	Paraformaldehyd
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase
RBW	Relative Biologische Wirksamkeit
RNF168	Ringfingerprotein 168
RNF8	Ringfingerprotein 8
RPA	Replikationsprotein A
ssDNA	Einzelsträngige DNA
TBB	4,5,6,7-Tetrabromo-2-azabenzimidazole
Tip60	Eine Histonacetyltransferase
TOPBP1	Topoisomerase (DNA) II binding protein 1
TSA	Trichostatin A
UBC13	Ubiquitin-conjugating enzyme 13
UV	Ultraviolett
VR	Vibrationsrelaxation
YFP	Yellow fluorescent protein

Einführung

1.1 Biologische Grundlagen der zellulären Reaktion auf DNA-Strahlenschäden

1.1.1 Aufbau des Zellkerns und des Chromatins

Der menschliche Körper besteht aus ca. 100 Billionen Zellen ([Schmidt et al., 2005](#)). Diese erfüllen sehr unterschiedliche Aufgaben und sind deshalb in Form und Funktion sehr verschieden. Trotzdem besitzen alle Zellen die gleiche Genausstattung. Die gesamte genetische Information ist im Zellkern einer jeden Zelle gespeichert. Der Zellkern ist von einer Kernmembran umgeben (siehe Abbildung [1.1a](#)), die eine Barriere für Ionen, gelöste Stoffe und Makromoleküle darstellt. Während der Mitose (Zellteilung) kondensiert das Chromatin zu dicht gepackten Chromosomen und die Kernstruktur löst sich auf, sodass die duplizierte Erbinformation auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt werden kann. Während der Interphase, wenn sich die Zelle nicht in der Mitose befindet, enthält der Zellkern folgende Hauptkomponenten ([Karp, 2005](#)):

- die **Kernmembran** umgibt den Zellkern
- die **Kernmatrix** bildet ein proteinhaltiges Fasergeflecht
- das **Kernplasma** ist die Flüssigkeit des Zellkerns mit vielen gelösten Substanzen
- ein oder mehrere **Nukleoli**, unregelmäßig geformte Gebilde, die an der Synthese der ribosomalen RNA und dem Zusammenbau der Ribosomen mitwirken
- das **Chromatin**, welches aus DNA (Desoxyribonukleinsäure) und den mit ihr assoziierten Proteinen, den sogenannten Histonen, besteht.

Die Grundbausteine der DNA sind die Nukleotide (siehe Abbildung [1.2](#)). Sie bestehen aus einem Zucker (Desoxyribose), einem Phosphat und einer der vier Basen Thymin (T), Adenin (A), Cytosin (C) oder Guanin (G). Diese Nukleotide binden kovalent über Phosphodiesterbindungen.

So entsteht eine Polynukleotidkette, die man als DNA-Strang bezeichnet. Sie hat ein sogenanntes 3' Ende mit einer freien Hydroxygruppe des Zuckers und ein 5' Ende mit einer freien Phosphatgruppe. Die Basen heben sich von dem Zucker-Phosphatgerüst ab und binden jeweils über Wasserstoffbrückenbindungen eine komplementäre Base aus einem zweiten gegenläufigen DNA-Strang. Hierbei paaren sich A und T sowie C und G. Auf diese Weise bildet sich ein DNA Doppelstrang, der als Doppelhelix eine energetisch günstige Gestalt annimmt. Das ge-

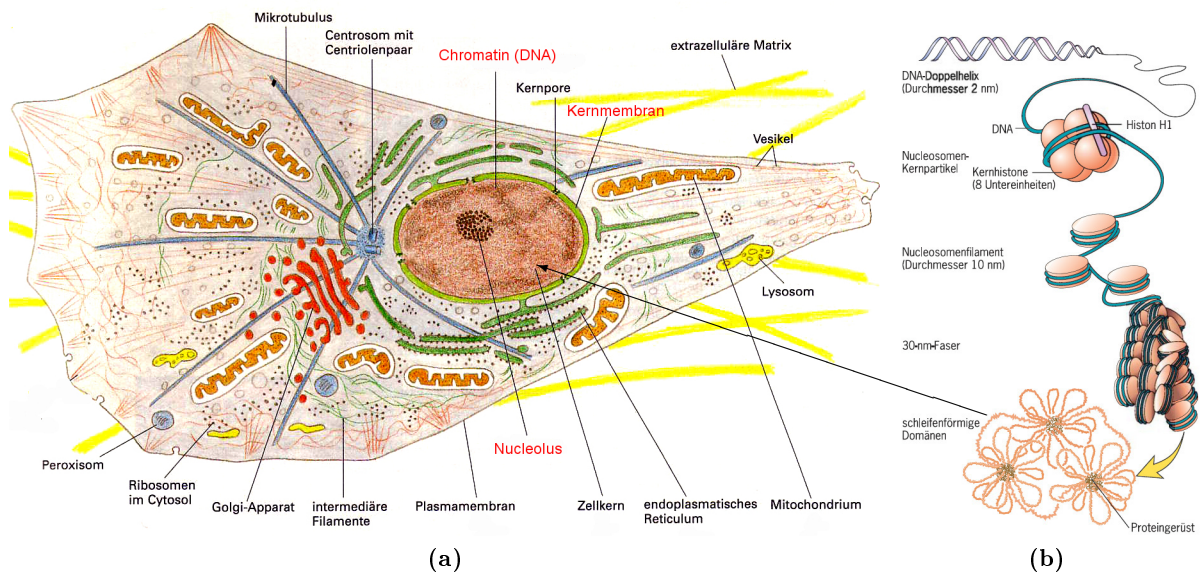


Abbildung 1.1: Eukaryotische Zelle und der Aufbau des Chromatins. *(a)*: Schematische Darstellung einer eukaryotischen Zelle: Viele verschiedene Organellen befinden sich im Zytoplasma. Der Zellkern bildet meist die größte Einheit (Abbildung modifiziert übernommen von [Alberts, 2001](#)). *(b)*: Das Chromatin befindet sich im Inneren des Zellkerns. Es ist aus DNA und Proteinen, den Histonen, aufgebaut. Der DNA Doppelstrang ist um die Kernhistone gewickelt. So bildet sich ein Nucleosomenfilament, das sich weiter zusammenlagert (Abbildung übernommen von [Karp, 2005](#)).

samte menschliche Genom besteht aus ca. 3 Milliarden Basenpaaren. Dies ergibt eine DNA Gesamtlänge von ca. zwei Meter. Sie muss allerdings in einem Zellkern, der in einer menschlichen Zelle einen Durchmesser von ca. $5\text{--}8\ \mu\text{m}$ hat, verstaut werden. Dazu ist eine sehr dichte Verpackung der DNA nötig, die dennoch einer bestimmten Ordnung unterliegen muss. Deshalb wird der DNA-Doppelstrang zunächst in regelmäßigen Abständen um Histonkerne gewickelt (siehe Abbildung 1.1b). Diese Verbindungen werden als Nucleosomen bezeichnet. So entsteht das Nucleosomenfilament, ein perlenkettenartiges Gebilde. Dieses lagert sich wiederum zu 30-nm-Chromatinfasern zusammen, die sich dann, wahrscheinlich eher unregelmäßig, immer dichter zusammen packen ([Alberts, 2001](#)).

1.1.2 Zelluläre Reaktion auf DNA-Schäden

In der DNA ist die gesamte Erbinformation im Kern einer jeden Zelle abgespeichert. Schädigungen im Erbgut können durch den Prozess der Mutagenese Krebskrankheiten hervorrufen. Nach Schätzungen finden aber täglich ca. 10.000 schädigende Ereignisse an der DNA in jeder Zelle statt ([Eckstein, 1998](#)). Um diesem entgegenzuwirken, entwickelten sich im Laufe der Evolution viele verschiedene Mechanismen, die die unterschiedlichen DNA-Schäden reparieren und korrigieren (zusammengefasst von [Christmann et al., 2003](#)). Aufgrund des oben beschriebenen doppelsträngigen Aufbaus der DNA, kann in den meisten Fällen, wie bei Basenmodifikationen, Basenverlusten oder UV (ultraviolett)-strahlungsinduzierten Dimeren, der ungeschädigte gegenläufige Strang als Vorlage dienen um den geschädigten fehlerfrei zu reparieren. Im Fall des Doppelstrangbruchs (DSB), bei dem die doppelsträngige DNA an einer Stelle komplett aufbricht, ist dies jedoch nicht der Fall. Die Enden müssen zusammengehalten, evtl. aufbereitet und wieder möglichst fehlerfrei

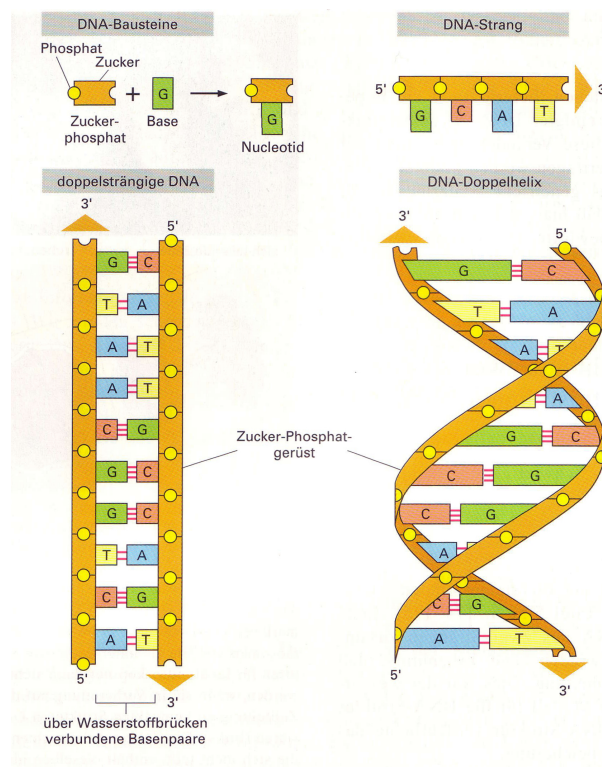


Abbildung 1.2: DNA und ihre Bausteine. Die DNA ist aus vier verschiedenen Nukleotiden aufgebaut. Jedes besteht aus einem Zucker, Phosphat und einer der vier Basen A, C, G oder T. Diese Nukleotide bilden einen DNA Strang, der sich mit einem zweiten gegenläufigen Strang zusammenlagert. Dieser Doppelstrang nimmt eine energetisch günstige Form als Doppelhelix ein (Abbildung modifiziert übernommen von [Alberts, 2001](#)).

zusammengefügt werden. Somit stellt der DSB große Herausforderungen an die Mechanismen der DNA-Reparatur.

Es gibt zwei Hauptmechanismen DSB zu reparieren, die "Nicht Homologe Endverknüpfung" (NHEJ) und die "Homologe Rekombination" (HR). Während in ersterer die Bruchenden nach vergleichsweise geringer Prozessierung wieder direkt zusammengefügt werden, dient bei letzterer ein anderer DNA-Abschnitt, meist das Schwesterchromatid, als Vorlage zur Reparatur des DSB. Da in der NHEJ keine Vorlage verwendet wird, wird diese im Allgemeinen, im Gegensatz zur HR, als fehleranfällig angesehen (zusammengefasst von [Christmann et al., 2003](#)).

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den ersten Erkennungs- und Prozessierungsmechanismen von DSB, weshalb diese im Folgenden genauer vorgestellt werden sollen. Eine wichtige Rolle bei der Erkennung von DSB spielt der MRN-Proteinkomplex, bestehend aus MRE11 (*meiotic recombination 11*), Rad50 und NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrom 1*). Die Struktur dieses Komplexes, nach heutiger Vorstellung, ist in [Abbildung 1.3](#) schematisch gezeigt. MRE11 ist hierbei das zentrale Protein. Es bindet die Proteine Rad50 und NBS1 und die DNA (zusammengefasst von [Williams et al., 2007](#)). Somit befestigt das MRE11 Protein vermutlich den MRN-Komplex an der DNA (zusammengefasst von [Bhatti et al., 2011](#)). Neben den DNA-Bindungseigenschaften besitzt MRE11 aber auch Prozessierungseigenschaften, nämlich einzelsträngige Endo- und doppelsträngige 3'-5' Exonukleaseaktivität ([Paull und Gellert, 1998](#); [Trujillo et al., 1998](#)). Im Komplex lagern sich zwei MRE11 Proteine mit zwei Rad50 Proteinen zusammen. Die Walker A- und Walker B-Domänen am C- und N-Terminus des Rad50 Proteins binden MRE11 und bil-

den so zusammen die Kopfdomäne des Komplexes. Der andere Teil des Rad50 Proteins, die Doppelwendel Domäne, stellt eine fadenförmige Struktur mit einer Länge von ca. 500 Å und einem sogenannten Zink-Haken am Enden dar. Diese Zink-Haken können sich über Zinkatome entweder gegenseitig innerhalb des Komplexes binden, oder verschiedene Komplexe miteinander vernetzen (siehe in Abbildung 1.3 rechts). Über die Rad50 Moleküle können dadurch ca. 1200 Å lange Brücken zwischen verschiedenen DNA-Abschnitten, z.B. Schwesterchromatiden, gebildet werden (Hopfner et al., 2002). Rad50 besitzt außerdem ATPase (Adenosintriphosphat-spaltende) Eigenschaften. Durch das Binden von je einem ATP können jeweils die N- mit den C- Enden von zwei Rad50 Proteinen verbunden werden. Dadurch werden die Dimere, zusätzlich zu der Bindung über MRE11, gekoppelt. Durch Hydrolyse und das Lösen von ATP können sich diese Bindungen wieder trennen und es entsteht eine offene Kopfstruktur des Komplexes (zusammengefasst von Williams et al., 2010). Diese Konformationsänderungen steuern vermutlich die MRE11 Nukleaseaktivitäten (Hopfner et al., 2001). NBS1, das dritte Protein im Komplex, hat die besondere Eigenschaft mehrere Phosphopeptidbindungsstellen zu besitzen: eine *Forkhead-associated* (FHA) Domäne und zwei *BRCA1 C Terminus* (BRCT) Domänen. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Proteine mit diesen Domänen interagieren, unter anderem *Mediator of DNA damage checkpoint protein 1* (MDC1) (Lloyd et al., 2009; Hari et al., 2010; Spycher et al., 2008), Ctp1 (Lloyd et al., 2009; Williams et al., 2009) und *Ataxia telangiectasia and Rad3-related Protein* (ATR) (Olson et al., 2007). Sehr wahrscheinlich interagieren aber noch viele andere Phosphoproteine mit diesen Domänen. Am anderen Ende des NBS1 Proteins, am N-Terminus, befinden sich Bindungsstellen für die Proteine MRE11 und *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM). Die Interaktion mit ATM spielt in der ATM-Aktivierung nach DSB-Induktion eine entscheidende Rolle (Lee und Paull, 2005).

Der MRN-Komplex erkennt den DSB und lagert sich an diesen an, wodurch wahrscheinlich eine, wie oben beschrieben, vernetzende Struktur im Chromatin gebildet wird, die beide DNA-Enden zusammenhält. Der Komplex steuert dann weitere Zellreaktionen wobei die Aktivierung von ATM eine besondere Rolle spielt.

Der initiale Schritt für die ATM-Aktivierung ist noch unklar. Eine Relaxation des Chromatins wird als erster Schritt diskutiert (Bakkenist und Kastan, 2003; Kozlov et al., 2011). Viele Experimente ließen annehmen, dass auch der MRN-Komplex bei der Aktivierung eine entscheidende Rolle spielt (Uziel et al., 2003; Lee und Paull, 2005; Falek et al., 2005). Andere Experimente zeigten jedoch, dass er nicht absolut nötig ist (Bhatti et al., 2011). Sun et al. (2009) schlugen folgenden Mechanismus für die ATM-Aktivierung vor: Durch den DSB wird der MRN-Komplex und CK2 (Casein Kinase 2) unabhängig voneinander an den DSB rekrutiert. CK2 phosphoryliert das Heterochromatin-Protein 1 (HP1)- β , wodurch sich HP1 β vom Chromatin löst und am Lysin 9 trimethylierte Histone 3 (H3K9me3) freigelegt werden. Der ATM-Tip60 Komplex, bestehend aus ATM und der Histonacetyltransferase TIP60, wird zum MRN-Komplex rekrutiert und ermöglicht die Interaktion mit H3K9me3. Durch die hoch regulierte Acetyltransferaseaktivität von Tip60 wird ATM acetyliert und dessen Kinaseaktivität aktiviert. Durch diese Aktivierung wird ATM, welches in inaktiver Form als Dimer oder Multimer vorliegt, zu Monomeren umgewandelt und an verschiedenen Stellen autophosphoryliert (Bakkenist und Kastan, 2003; Kozlov et al., 2006, 2011). Nachdem ATM aktiviert wurde, phosphoryliert es die Histonvariante H2AX am Serin 139 in der Chromatenumgebung (Megabasenbereich) des DSB. In Säugerzellen beträgt der Anteil von H2AX 2 % bis 25 % der Gesamtmenge der Histonvariante H2A (Rogakou et al., 1998). Die phosphorylierte Form von H2AX wird als γ H2AX bezeichnet. Neben ATM können auch andere Kinasen der PIKK-Familie (*Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase*), wie ATR und *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK), H2AX phosphorylieren (Rogakou et al.,

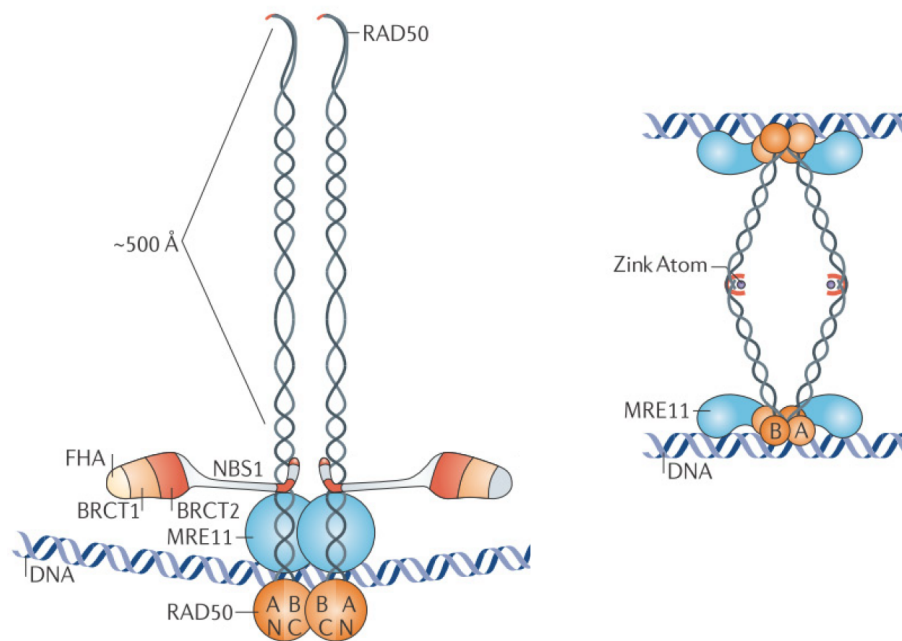


Abbildung 1.3: Struktur des MRN-Komplexes am DSB. NBS1 besitzt mehrere Phosphopeptidbindungsstellen: FHA und eine Tandem BRCT-Domäne. Rad50 besitzt Walker A und Walker B Domänen, an die MRE11 und NBS1 binden. Außerdem besitzt Rad50 die langen Doppelwendel Domänen mit dem Zink-Haken am Ende. In der rechten Abbildung sind zwei MRN-Komplexe gezeigt, die über die Zink-Haken und je ein Zink Atom miteinander verbunden sind, und dadurch zwei DNA-Stränge zusammenhalten (Abbildung modifiziert übernommen von [Stracker und Petrini, 2011](#)).

1998, 1999; [Burma et al., 2001](#)). Nach dieser Phosphorylierung von H2AX zu γ H2AX kann MDC1 über seine BRCT Domäne an diese binden ([Stewart et al., 2003](#)). (Zusammengefasst von [Stucki und Jackson, 2006](#)). Über eine positive Rückkopplungsschleife wird die Akkumulation von Proteinen, wie dem MRN-Komplex und ATM, um den DSB verstärkt. MDC1 wirkt hierbei als Bindeglied zwischen γ H2AX und ATM ([Lou et al., 2006](#)). MDC1 wird, sobald es am geschädigten Chromatin gebunden ist, ebenfalls ATM-abhängig phosphoryliert. Danach rekrutiert es die E3 Ubiquitin Ligase RNF8 (*Ringfingerprotein 8*) an den DSB ([Kolas et al., 2007](#)). Zusammen mit UBC13 (*Ubiquitin-conjugating enzyme 13*) katalysiert RNF8 die Bildung von Poly-Ubiquitinketten am Lysin-63 der H2A-Histone ([Mailand et al., 2007](#)). [Bekker-Jensen et al. \(2010\)](#) zeigten, dass zusätzlich zu RNF8, UBC13 und der MDC1-Phosphorylierung, noch die Ubiquitinligase HERC2 (Hect domain and RLD 2) als Kofaktor benötigt wird. Diese Ubiquitinierung ist Voraussetzung für die 53BP1- (*p53 binding protein*) und BRCA1- (*breast cancer type 1 susceptibility protein*) Rekrutierung, aber nicht für die Focibildung von γ H2AX und MDC1 und nicht für die ATM-Aktivierung ([Mailand et al., 2007](#); [Jacquemont und Taniguchi, 2007](#)). Nach der Histon-Ubiquitinierung durch RNF8 mit UBC13 wird in den nächsten Schritten eine weitere E3 Ubiquitin-Protein Ligase namens RNF168 (Ringfingerprotein 168) rekrutiert, welche auf gleiche Weise wie RNF8 Histone ubiquitiniert und dadurch vermutlich die Focibildung verstärkt ([Doil et al., 2009](#)).

[Huyen et al. \(2004\)](#) konnten zeigen, dass 53BP1 über seine zwei Tandem-Tudor-Domänen an Serin 79 methylierte Histone H3 (H3K79me) bindet. Fehlt diese Domäne oder die Methylierung dieser Histone, so bindet 53BP1 nicht. Allerdings konnte keine strahlungsbedingte Erhöhung der H3K79-Methylierung festgestellt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass Histon 3 (H3) in

unbestrahlten und bestrahlten Zellen gleichermaßen gut an 53BP1 bindet. Aus diesen Gründen wird angenommen, dass die Methylierungsstelle in der höheren Chromatinstruktur verdeckt ist. Durch eine strahlungsinduzierte Dekondensation des Chromatins um den DSB, wie bereits von [Bakkenist und Kastan \(2003\)](#) vorgeschlagen, könnte die Methylierungsstelle nach außen präsentiert werden, sodass 53BP1 binden kann. Später wurde von [Botuyan et al. \(2006\)](#) beschrieben, dass 53BP1 auch an die Methylierungsstelle K20 am Histon 4 (H4) bindet. Die beiden Methylierungsstellen erfüllen vermutlich eine redundante und zelllinienabhängige Funktion (zusammengefasst von [FitzGerald et al., 2009](#)). Nach momentaner mechanistischer Vorstellung führt die schadensinduzierte Proteinrekrutierung mit den unzähligen Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen zu einer mehr relaxierten Form des Chromatins um den DSB. Dadurch werden die Methylierungsstellen besser zugänglich und 53BP1 kann dort binden (zusammengefasst von [Stewart, 2009](#)). Diese Abläufe sind in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt. Sowohl MDC1 als auch 53BP1 besitzen keinerlei enzymatische Aktivität, sondern bilden vielmehr eine Ladeplattform für andere Proteine (zusammengefasst von [FitzGerald et al., 2009](#)).

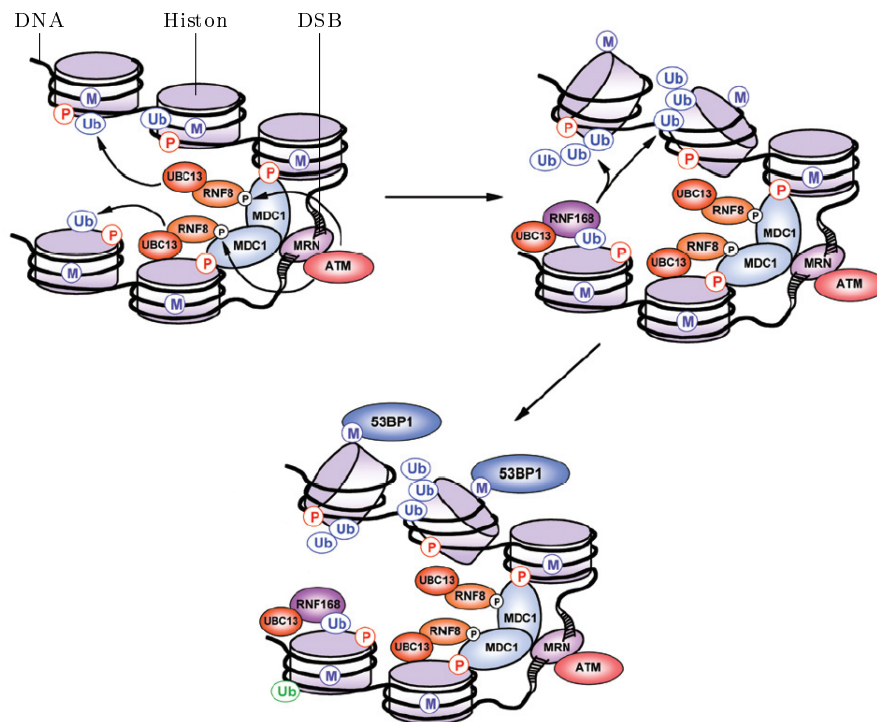


Abbildung 1.4: Modell der Signalkaskade und Proteinrekrutierung am DSB. Der detaillierte Ablauf und die Proteinfunktionen sind im Text beschrieben. P: Phosphorylierung, Ub: Ubiquitinierung, M: Methylierung (Abbildung modifiziert übernommen von [Stewart, 2009](#)).

Neben ATM ist auch ATR, eine zweite Kinase aus der PIKK-Familie, an der DNA-Reparatur beteiligt. Während ATM durch DSB aktiviert wird, wird ATR durch viele verschiedene Arten von DNA-Schäden aktiviert. All diese Aktivierungen werden aber vermutlich durch eine Struktur, nämlich einzelsträngige DNA (ssDNA), bedingt ([Zou und Elledge, 2003](#)). (Zusammengefasst von [Cimprich und Cortez, 2008](#); [Lovejoy und Cortez, 2009](#)). Die dadurch ausgelöste Signalkaskade ist in Abbildung 1.5 dargestellt. ssDNA kommt in Zellen nicht in reiner Form vor, sondern wird

vom Replikationsprotein A (RPA) gebunden (Wold und Kelly, 1988). (Zusammengefasst von Wold, 1997). (1) Das *ATR-interacting protein* (ATRIP) erkennt die mit RPA besetzte ssDNA. ATR wird durch Interaktion mit ATRIP an diese Strukturen rekrutiert (Zou und Elledge, 2003; Ball et al., 2005; Falck et al., 2005; Ball et al., 2007). (2) 9-1-1 (*checkpoint clamp* mit den Proteinen RAD9-HUS1-RAD1) erkennt DNA-Enden mit anschließenden RPA-dekorierten ssDNA Bereichen und wird an das 5' Ende rekrutiert. 9-1-1 bringt den ATR-Aktivator TOPBP1 (*Topoisomerase (DNA) II binding protein 1*) durch direkte Interaktion an den Schaden (Delacroix et al., 2007). (3) ATR wird durch TOPBP1 aktiviert (Kumagai et al., 2006; Mordes et al., 2008). (4) Daraufhin phosphoryliert ATR Substrate wie CHK1 (*Checkpoint kinase 1*). Dies führt zu verschiedenen Zellantworten auf den DNA-Schaden, wie z.B. zur Aktivierung des G2 Kontrollpunkts. Dadurch werden die geschädigten Zellen daran gehindert in die Mitose zu laufen und fehlerhafte DNA-Information an Tochterzellen weiterzugeben. (Zusammengefasst von Nam und Cortez, 2011; Cimprich und Cortez, 2008). Vereinfacht wird ATR durch ssDNA mit RPA gebunden, und anschließend über das 5' Ende am DSB aktiviert (Cimprich und Cortez, 2008).

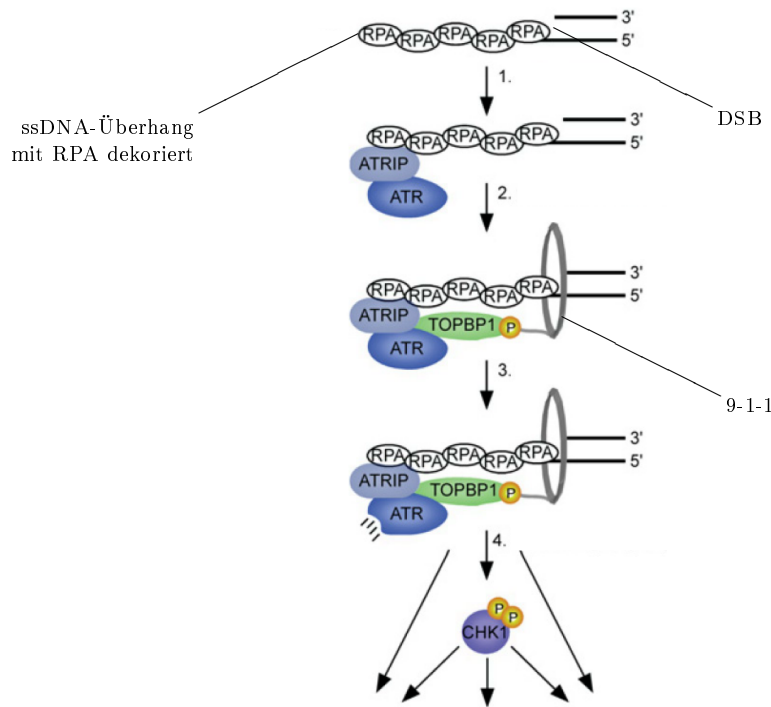


Abbildung 1.5: Rekrutierung und Funktion von ATR am DSB. 1. ATR-ATRIP wird an mit RPA dekorierte ssDNA rekrutiert. 2. 9-1-1 und TOPBP1 werden rekrutiert. 3. ATR wird aktiviert. 4. ATR phosphoryliert Substrate (Abbildung modifiziert übernommen von Nam und Cortez, 2011).

1.2 Physikalische Grundlagen der Schwerionenbestrahlung und deren besondere Wirkung

Am 13. Dezember 1997 wurden am Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH (GSI) die ersten Tumorpatienten mit schweren Ionen bestrahlt. Dies war die erste Tumorthherapie mit Kohlenstoffionen in Europa und die erste intensitätsmodulierte Schwerionentherapie weltweit.

Bis 2008 wurden an der GSI 440 Patienten mit großem Erfolg bestrahlt. Zunächst beschränkte sich die Therapie auf Tumore im Kopf- und Halsbereich. Später wurden auch Tumore längs der Wirbelsäule und Prostata Tumore bestrahlt. Aufgrund der guten Ergebnisse ist in Heidelberg eine weitere Bestrahlungsanlage errichtet worden. Weitere Anlagen befinden sich in Marburg und Kiel im Bau.

Im Vergleich zur konventionellen Strahlentherapie hat die Schwerionentherapie zwei wesentliche Vorteile. Dies ist zum einen eine höhere und konformere Dosis im Tumor, wobei das Normalgewebe weitgehend verschont bleibt, und zum anderen eine höhere biologische Wirksamkeit gerade bei sonst sehr strahlenresistenten Tumoren. Diese Vorteile werden im Folgenden erläutert.

Physikalische Vorteile der Schwerionenbestrahlung

In der Strahlentherapie ist die Dosis D als absorbierte Energie E pro Masse m definiert. Die Einheit ist $1 \text{ Gray} = 1 \text{ J/kg}$.

$$D [\text{Gy}] = \frac{E}{m} \left[\frac{\text{J}}{\text{kg}} \right] \quad (1.1)$$

Photonen deponieren ihre Energie über den Photo- und Comptoneffekt sowie über die Paarbildung. Bei Bestrahlung mit niederenergetischer Röntgenbestrahlung nimmt die Dosis exponentiell mit der Eindringtiefe in Materie ab (siehe Abbildung 1.6). Bei hochenergetischer Photonenbestrahlung werden die erzeugten Comptonelektronen stark nach vorne gestreut. Dadurch wird ein Teil der Energie von der Oberfläche in die Materie transportiert und die Dosis steigt in den ersten Zentimetern an. Der exponentielle Abfall nach dem Dosismaximum wird mit steigender Photonenenergie flacher.

Protonen und Ionen deponieren ihre Energie im therapeutisch relevanten Energiebereich von einigen hundert MeV/u, durch Wechselwirkung mit den Targetelektronen. Der Energietransfer auf die Materie wird durch den LET (linearen Energietransfer) beschrieben (siehe Gleichung 1.2). Der LET wird typischerweise in den Einheiten $\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ angegeben.

$$LET = \frac{dE}{dx} \quad (1.2)$$

dx bezeichnet die zurückgelegte Strecke und dE den mittleren Energietransfer aufgrund von Kollisionen (ICRU, 1970). Der LET kann durch die Bethe-Bloch Formel beschrieben werden (Bethe, 1930; Bloch, 1933a,b):

$$\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^4 Z_{eff}^2}{m_e v^2} \frac{\rho N_A Z_t}{A_t} \left[\ln \frac{2m_e c^2 \beta^2}{I(1 - \beta^2)} - \beta^2 \right] \quad (1.3)$$

e bezeichnet die Elementarladung, m_e die Elektronenmasse, N_A die Avogadro-Konstante und c die Lichtgeschwindigkeit. Z_t ist die Ordnungszahl, A_t die Massezahl und ρ die Dichte des Targetmaterials. β ist gegeben durch $\beta = \frac{v}{c}$ mit v der Geschwindigkeit des Ions. I ist das mittlere Anregungspotential (Details siehe z.B. Sternheimer et al., 1982; ICRU, 1984, 1993). Z_{eff} ist die effektive Ladung des Ions. Sie ist abhängig von der Geschwindigkeit des Ions. Dieser Zusammenhang wird durch die Barkas Formel beschrieben (Barkas, 1963):

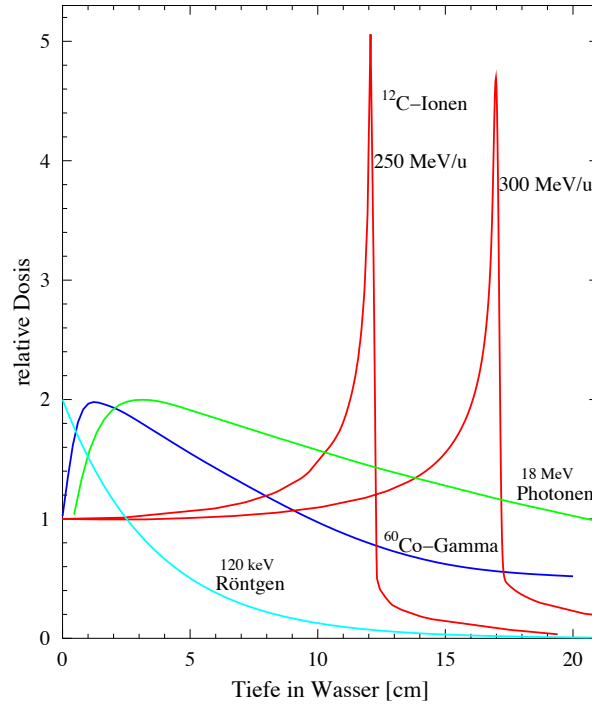


Abbildung 1.6: Tiefendosis-Profil von Photonen und Ionen. Photonen applizieren kurz nach dem Eindringen ihre maximale Dosis. Mit zunehmender Eindringtiefe nimmt sie ab. Die Dosis von Kohlenstoffionen (^{12}C) ist im Eingangskanal gering. Am Ende der Reichweite entsteht ein schmales Dosismaximum, der so genannte Bragg-Peak (Abbildung modifiziert übernommen von [Kraft, 2008](#)).

$$Z_{eff} = Z \left[1 - \exp \left(-125\beta Z^{-\frac{2}{3}} \right) \right] \quad (1.4)$$

Der LET, beschrieben durch Formel 1.3, wird durch die $1/v^2$ und Z_{eff} Abhängigkeit dominiert. Mit abnehmender Geschwindigkeit, also zunehmender Eindringtiefe, nimmt die Wechselwirkung der Ionen mit dem Targetmaterial zu und der LET steigt an. Bei kleinen Energien nehmen die Ionen Elektronen vom Targetmaterial auf und Z_{eff} fällt schnell ab. Dies führt zu einem ausgeprägten LET Maximum bei niedrigen Ionenenergien. Monoenergetische Ionen verursachen somit in tief liegenden Regionen eine sehr hohe und räumlich stark abgegrenzte Dosis, den so genannten Bragg-Peak, während die Dosis im Eingangskanal und besonders nach dem Bragg-Peak deutlich geringer ist (siehe Abbildung 1.6). Dieses so genannte invertierte Tiefendosis-Profil ist, bei der Behandlung von tief liegenden Tumoren, der wesentliche Vorteil der Ionenbestrahlung im Vergleich zur konventionellen Photonenbestrahlung. Die Tiefenlage des Bragg-Peaks lässt sich durch die Teilchenenergie variieren. Mit Hilfe von Magnetfeldern ist es möglich den feinen "Nadelstrahl" in lateraler Richtung abzulenken. In Kombination mit der Energievariation, ermöglicht dies die punktgenaue Positionierung des Bragg-Peaks, sowohl in der Tiefe als auch in lateraler Richtung. Dadurch kann die Ausdehnung eines Tumors, in einem so genannten Rasterscan-Verfahren, dreidimensional abgefahren werden ([Haberer et al., 1993](#)). Die Dosisdeposition im Tumor lässt sich so präzise kontrollieren, während umliegendes gesundes Gewebe und Risikoorgane bestmöglich verschont werden können.

Auch Protonen besitzen ein invertiertes Tiefendosis-Profil. Wie von [Kraft \(2000\)](#) zusammengefasst unterscheiden sie sich trotzdem stark von Schwerionen für die Anwendung in der Tu-

morthapie. Im Gegensatz zu Protonen fragmentieren Schwerionen. Die Fragmentierung des Kohlenstoffstrahls führt zu einem nicht erwünschten Dosisschwanz über den Bragg-Peak hinaus. Jedoch führt die Fragmentierung bei der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen dazu, dass Positronen emittierende Kohlenstoffisotope entstehen mit ähnlicher Reichweite wie die primären Kohlenstoffionen. Mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie können diese Kohlenstoffisotope und damit auch der primäre Kohlenstoffstrahl lokalisiert werden. Dies ermöglicht die Kontrolle der geplanten Dosisdeposition. Zusätzlich zur Fragmentierung bestehen zwei weitere wesentliche Unterschiede zwischen der Protonen- und Schwerionenbestrahlung. Protonen zeigen eine größere laterale und longitudinale Streuung, was die exakte Dosisdeposition erschweren kann. Der entscheidende Vorteil der Schwerionenbestrahlung ist die erhöhte biologische Wirksamkeit, die differentiell auf den Hochdosisanteil, das Braggmaximum, bestimmt ist.

Biologische Vorteile der Schwerionenbestrahlung

Mit steigender applizierter Dosis nimmt das Zellüberleben im Allgemeinen ab (siehe Abbildung 1.7).

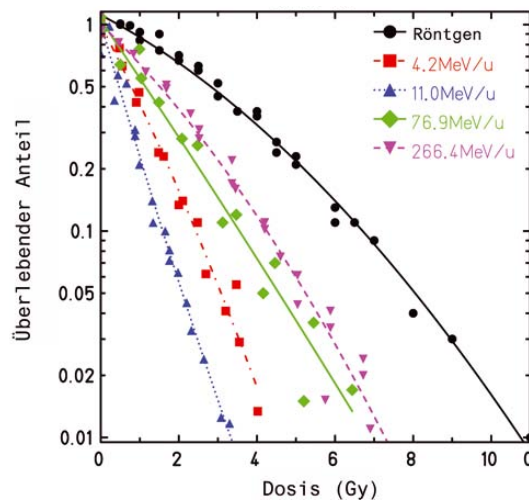


Abbildung 1.7: Zellüberleben bei Photonen- und Ionenbestrahlung in Abhängigkeit der physikalischen Dosis. Es wurden CHO-K1 (Chinesische Hamster Ovarien) Zellen mit 250 kV Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffionen verschiedener Energien bestrahlt. Mit zunehmender Dosis nimmt das Zellüberleben ab. Dieser Abfall ist bei Ionenstrahlung stärker (Abbildung modifiziert übernommen von Kraft, 2008).

Bei Ionenbestrahlung ist dieser Effekt stärker ausgeprägt als bei der Photonenbestrahlung. Ein gleich stark reduziertes Zellüberleben wird bei Ionenbestrahlung bereits mit einer geringeren Dosis erzielt (Weyrather und Kraft, 2004). Folglich zeigt die Ionenbestrahlung eine erhöhte biologische Wirksamkeit im Vergleich zur Photonenbestrahlung. Um dies quantitativ beschreiben zu können, wurde die Relative Biologische Wirksamkeit (RBW) eingeführt. Sie beschreibt das Verhältnis der absorbierten Dosen, um den gleichen biologischen Effekt zu erhalten:

$$RBW = \frac{D_\gamma}{D_I} \Big|_{\text{Isoeffekt}} \quad (1.5)$$

Als Referenz zur Ionenbestrahlung D_I dient in den meisten Fällen Photonenbestrahlung D_γ von 200 kV oder 250 kV. Der RBW nimmt für verschiedene Isoeffekthöhen (z. B. 50 %, 10 %, 1 %) unterschiedliche Werte an und ist somit nicht konstant. Zum Vergleich wird meist der RBW

mit einem Isoeffekt von 10 % Zellüberleben angegeben. Mit abnehmender Ionenenergie fallen die Kurven in Abbildung 1.7 tendenziell stärker ab. Dies bedingt eine zunehmende biologische Wirksamkeit. Die Ionenenergie nimmt mit der Eindringtiefe ab. Abbildung 1.8 zeigt die physikalische Dosis, das Zellüberleben und die RBW in Abhängigkeit von der Eindringtiefe. Im Bragg-Peak hat die RBW ihr Maximum. Folglich nimmt das Zellüberleben im Bragg-Peak stärker ab als bei einer gleichen Dosis mit Protonen- oder Photonenbestrahlung. Erst am distalen Ende des Bragg-Peaks nimmt der RBW wieder ab.

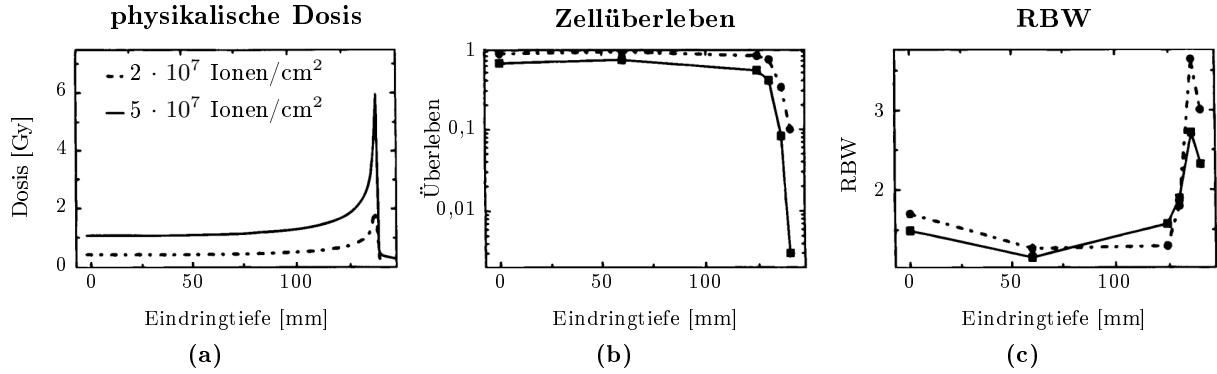


Abbildung 1.8: Dosis, Zellüberleben und RBW in Abhängigkeit von der Eindringtiefe in ein Wasserphantom, bei Bestrahlung mit Kohlenstoffionen mit einer Energie von 270 MeV/u. (a): Physikalische Dosis; (b): Relatives Zellüberleben von CHO (Chinesische Hamster Ovarien) Zellen; (c): Berechnete RBW (Abbildung modifiziert übernommen von Kraft, 1999).

Aufgrund der unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit kann die Strahlenwirkung auf biologische Proben nicht allein durch die physikalische Dosis D beschrieben werden. Deshalb wurde der Begriff der biologisch effektiven Dosis (BED) eingeführt. Sie berücksichtigt Unterschiede in der Strahlenwirkung und ist definiert als das Produkt aus der physikalischen Dosis D und der RBW :

$$BED = RBW \cdot D \quad (1.6)$$

Durch die Multiplikation der beiden Tiefenprofile von D und RBW (Abbildungen 1.8a und 1.8c) entsteht für die BED eine Kurve mit einem sehr ausgeprägten Maximum am Strahlende. Das invertierte Dosisprofil wird folglich durch die erhöhte biologische Wirksamkeit im Bragg-Peak zusätzlich verstärkt.

Im Folgenden werden die Ursachen für die erhöhte biologische Wirksamkeit auf mikroskopischer Ebene näher erläutert.

Wirkung der Schwerionen auf mikroskopischer Ebene

Ein einzelnes Röntgen- oder γ -Photon deponiert über den Photo-, den Comptoneffekt oder die Paarbildung aufgrund der geringen Wechselwirkungswahrscheinlichkeit nur eine relativ geringe Energie in einem Zellkern. Eine Dosis von 1 Gy oder mehr kann deshalb nur mit sehr vielen Photonen erreicht werden. Man spricht deshalb auch von locker ionisierender Strahlung. Eine homogene Dosisverteilung, auch auf mikroskopischer Ebene, ist die Folge. Diese Dosisverteilung bei Röntgenbestrahlung ist in Abbildung 1.9a für eine Fläche von $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ gezeigt, die in etwa der Größe eines Zellkerns entspricht.

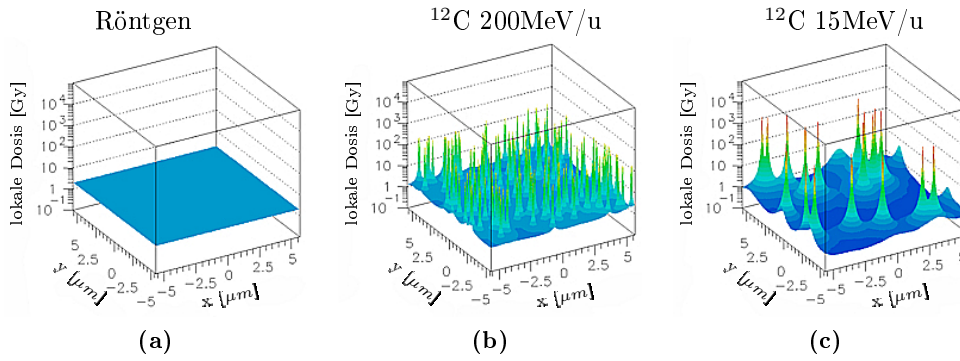


Abbildung 1.9: Dosisverteilung nach Photonen- (a) und Kohlenstoffionen- (b)(c) Bestrahlung auf einer Fläche von $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$. Dies entspricht in etwa der Größe eines Zellkerns. Die Kohlenstoffionen besaßen eine Energie von 200 MeV/u bzw. 15 MeV/u. In allen Fällen wurde eine durchschnittliche Dosis von 2 Gy deponiert. Nach Photonenbestrahlung ist die Dosis völlig homogen verteilt. Nach Kohlenstoffionen-Bestrahlung werden die lokalen Dosismaxima mit fallender Ionenenergie höher und schärfer (Abbildung modifiziert übernommen von [Scholz, 2003](#)).

Protonen und Ionen deponieren ihre Energie durch Wechselwirkung mit den Targetelektronen. Der größte Teil der transferierten Energie wird auf die Elektronen als kinetische Energie übertragen, die in weiteren Elektronenstößen Energie abgeben. Dies führt zu einer radialen Dosisverteilung wie in [Abbildung 1.10](#) gezeigt.

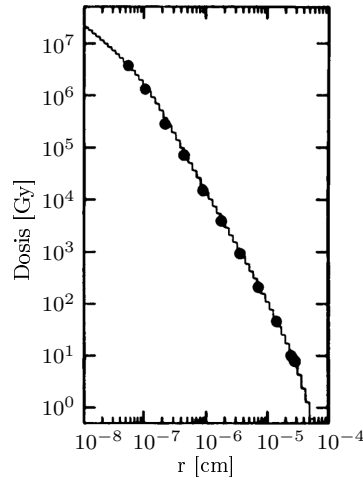


Abbildung 1.10: Radiales Dosisprofil von O-Ionen mit einer Energie von 2,57 MeV/u in Wasserdampf (Abbildung modifiziert übernommen von [Krämer und Kraft, 1994](#)).

Die Dosis nimmt über viele Größenordnungen mit $1/r^2$ ab. Abweichungen existieren für sehr geringe Ionenenergien, kleine Abstände ($r < 10\text{ nm}$) und große Abstände ([Krämer und Durante, 2010](#)). Die Dosisdeposition für große Abstände ist limitiert durch die maximale Reichweite der Elektronen. Sie ist gegeben durch ([Kiefer und Straaten, 1986](#); [Scholz, 2003](#)):

$$r_{max} = 0,05 E^{1,7} \quad (1.7)$$

r_{max} bezeichnet die maximale Reichweite in μm und E die spezifische Energie des Ions in MeV/u. Mit abnehmender Ionenenergie wird die Spurbreite folglich kleiner und die Dosis wird zunehmend

konzentrierter. Insbesondere langsame Ionen verursachen somit sehr lokal, sehr hohe Dosen entlang der Trajektorie, wobei andere Bereiche des Zellkerns praktisch unversehrt bleiben (siehe Abbildungen 1.9b und 1.9c). Aufgrund dieser sehr lokalen Dosisdeposition bezeichnet man Ionenstrahlung als dicht ionisierend. Die mittlere Bestrahlungsdosis lässt sich nach folgender Formel bestimmen:

$$D[Gy] = 1,602 \cdot 10^{-9} \cdot LET \left[\frac{keV}{\mu m} \right] \cdot F \left[\frac{1}{cm^2} \right] \cdot \frac{1}{\rho} \left[\frac{cm^3}{g} \right] \quad (1.8)$$

Hierbei bezeichnet F die Ionenfluenz. Da in den folgenden Experimenten dünne Zellschichten bestrahlt wurden, konnte ein konstanter LET angenommen werden. Im Allgemeinen ist dies aber nicht möglich, da sich der LET mit der Eindringtiefe ändert.

Zusammengefasst lässt sich hieraus ableiten, dass durch Bestrahlung mit Ionen sehr lokal, extrem hohe Dosen innerhalb von Zellkernen deponiert werden können. Daraus resultiert ein sehr komplexes und dichtes DNA Schadensmuster entlang der Ionen-Trajektorie, das nur sehr schwer repariert werden kann. Dies bedingt vermutlich die hohe biologische Wirksamkeit von Schwerionen (Heilmann et al., 1996). Außerdem bringt die inhomogene Dosisverteilung und damit verbundene lokalisierte Schadenserzeugung für die Untersuchung der DNA-Reparaturprozesse wesentliche Vorteile mit sich. Es können schwerwiegende Schäden wie Doppelstrangbrüche subnuklear erzeugt werden, um so die Akkumulation verschiedener Proteine an diese Schadensstellen untersuchen zu können (Taucher-Scholz und Jakob, 2007; Tobias et al., 2010).

1.3 FRAP, eine Methode zur Analyse des dynamischen Verhaltens von fluoreszenzmarkierten Proteinen

Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) ist eine auf der Fluoreszenzmikroskopie basierende Messtechnik zur Untersuchung von Molekülbewegungen. Sie wurde bereits in den 70er Jahren angewandt, um die Beweglichkeit von Membranmolekülen zu messen. Die ersten Publikationen hierzu stammen vermutlich von Poo und Cone (1973, 1974) und von Edidin et al. (1976). Schon zuvor wurde GFP (*green fluorescent protein*) durch Shimomura et al. (1962) entdeckt. Aber erst Jahrzehnte später wurde von Prasher et al. (1992) das Gen von GFP kloniert und Chalfie et al. (1994) und Inouye und Tsuji (1994) konnten zeigen, dass die Expression des Gens in anderen Organismen eine grüne Fluoreszenz bewirkt. Mit der näheren Charakterisierung und Weiterentwicklung des GFPs durch R. Y. Tsien in den darauf folgenden Jahren, erlebte die gesamte Fluoreszenzmikroskopie einen regelrechten Boom. (Zusammengefasst von Tsien, 1998). Auch für die FRAP Technik ergaben sich sehr viele neue Anwendungsgebiete. Die experimentellen Möglichkeiten und damit auch die Anzahl der Publikationen auf diesem Gebiet nahm stark zu.

Das Prinzip der FRAP Messungen ist das folgende: In einer lebenden Zelle wird ein Protein exprimiert, das mit einem fluoreszierenden Farbstoff, meist GFP, konjugiert ist. In einem kleinen Bereich der Zelle werden, durch einen sehr hellen und fokussierten Laserstrahl, die fluoreszierenden Markierungen der sich dort befindenden Proteine irreversibel gebleicht. Damit werden die Proteine in diesem Bereich für die Fluoreszenzmikroskopie unsichtbar gemacht, behalten aber ihre biologischen Eigenschaften und Funktionen bei. Durch das Messen der Fluoreszenzintensität im gebleichten Bereich kann nun bestimmt werden, wie schnell das gebleichte Protein aus dem

Bereich hinaus wandert und ungebleichtes Protein in den Bereich eindringt. Somit spiegelt die Wiederzunahme der Fluoreszenz im gebleichten Bereich direkt die Proteinmobilität und mögliche Bindungseigenschaften des markierten Proteins wider. Dieses Prinzip ist in Abbildung 1.11 schematisch dargestellt.

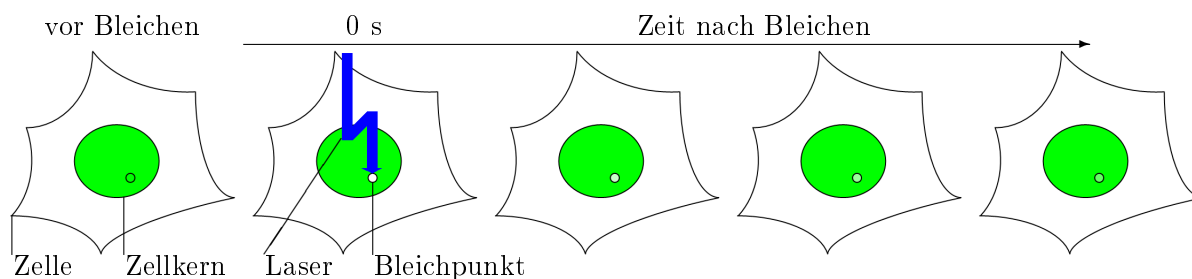


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung des FRAP-Messprinzips. Ein GFP markiertes Protein, das im Zellkern lokalisiert ist, wird in einem kleinen Bereich (Bleichpunkt) irreversibel gebleicht. Die mittlere Fluoreszenzintensität in diesem gebleichten Bereich wird über die Zeit gemessen und mit dem Signal vor dem Bleichen verglichen. Die Geschwindigkeit, mit der die gebleichten Proteine den Bleichpunkt verlassen, und ungebleichtes Protein aus der Umgebung den Bleichpunkt füllt, spiegelt direkt die Dynamik des markierten Proteins wider.

Über die Jahre wurden zahlreiche FRAP-Variationen entwickelt, bei denen im Wesentlichen die Bleichgeometrie geändert wurde, z.B. wurde ein Streifen oder der halbe Zellkern gebleicht. Aber auch zahlreiche, oft sehr umfangreiche mathematische Modelle wurden entwickelt, um die Mobilität und Bindung der Proteine aus den FRAP-Messergebnissen zu quantifizieren. [Carrero et al. \(2003\)](#) geben hierzu einen Überblick über die Annahmen, Vorteile und Einschränkungen verschiedener mathematischer Modelle.

1.4 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), eine Methode zur Analyse von Proteininteraktionen

1.4.1 Grundlegende Prinzipien des Förster-Resonanzenergietransfers

Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ist ein Prozess, bei welchem, unter bestimmten Voraussetzungen, Energie durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung strahlungsfrei von einem angeregten Donor auf einen Akzeptor übertragen wird. Hierbei spielen (1) die spektralen Eigenschaften von Donor und Akzeptor, (2) deren räumliche Orientierung zueinander und (3) deren Abstand entscheidende Rollen. Auch wenn grundlegende Erkenntnisse zum strahlungsfreien Energietransfer zweier Moleküle schon viel früher durch Experimente gewonnen und beschrieben wurden, lieferte schließlich [Förster \(1948\)](#) die Theorie zur quantitativen Beschreibung des Prozesses.

Wie in Abbildung 1.12a zu sehen, wird durch Absorption von Photonen ein Elektron des Chromophors in einen höheren Energiezustand (hier: S_1 oder S_2) angehoben. Jedoch nicht die ganze absorbierte Energie wird wieder radiativ durch Abstrahlung von Photonen abgegeben. Auch über viele strahlungslose, nicht radiative Prozesse, kann die Energie abgegeben werden. Hierzu gehören die Vibrationsrelaxation (VR), die Interkombination (ISC), die interne Konversion (IC) und andere nicht strahlende Prozesse (A). Zur Beschreibung des Verhältnisses von radiativer zu nicht radiativer Energieabgabe, wurde die Quanteneffizienz (Q) eingeführt. Zu den radiativen Prozessen gehören die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz. Tripletzustände haben lange Le-

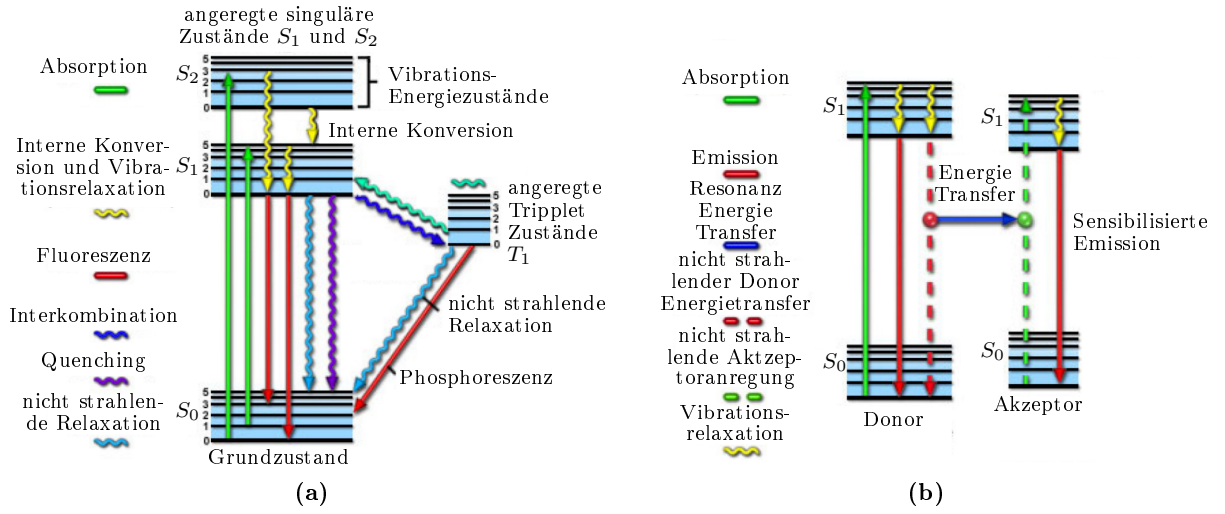


Abbildung 1.12: Jablonski Diagramme mit möglichen Übergängen. (a): für ein Chromophor (Abbildung modifiziert übernommen von Johnson und Davidson, 2011) (b): für zwei Chromophore mit Energietransfer (FRET) (Abbildung modifiziert übernommen von Herman et al., 2011).

benszeiten und werden deshalb durch andere Prozesse gequencht (Cantor und Schimmel, 1980). Außerdem sind Übergänge vom Singulett- ins Tripletsystem quantenmechanisch verboten und deshalb selten. Aus diesen Gründen kann die Phosphoreszenz vernachlässigt werden. Alle weiteren, hier aufgeführten radiativen Prozesse beschränken sich deshalb auf die Fluoreszenz (F). Damit lässt sich die Quanteneffizienz mit den Ratenkonstanten k für die einzelnen Prozesse (unter Vernachlässigung von stimulierter Emission) wie folgt beschreiben:

$$Q = \frac{k_F}{k_F + k_{VR} + k_{ICS} + k_{IC} + k_A} \quad (1.9)$$

Unter bestimmten Voraussetzungen, die später genauer beschrieben werden, kann das angeregte Chromophor seine Energie auch auf ein zweites Chromophor übertragen. Dies ist in Abbildung 1.12b gezeigt. Die Effizienz E dieses Förster-Resonanzenergietransfers ist definiert durch folgendes Verhältnis:

$$E = \frac{\text{Anzahl der vom Donor zum Akzeptor transferierten Quanten}}{\text{Anzahl der vom Donor absorbierten Quanten}} \quad (1.10)$$

Dies lässt sich analog zu Gleichung 1.9 ebenfalls mit Ratenkonstanten ausdrücken, wobei sich bis auf k_{FRET} alle anderen Ratenkonstanten k allein auf den Donor D beziehen.

$$E = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + k_{F,D} + k_{VR,D} + k_{ICS,D} + k_{IC,D} + k_{A,D}} \quad (1.11)$$

Die Transferrate k_{FRET} wurde durch Förster (1965a, Gleichung 10.10) folgendermaßen formuliert:

$$k_{FRET} = \frac{9\kappa^2(\ln 10)k_{F,D}}{128\pi^5 n^4 N R^6} \int f_D(\lambda) e_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1.12)$$

κ beschreibt die gegenseitige Dipolausrichtung, also die relative räumliche Orientierung, des Donors und des Akzeptors durch folgende Gleichung:

$$\kappa = (\cos\alpha - 3\cos\beta\cos\gamma)^2 \quad (1.13)$$

Die Lage der in Gleichung 1.13 verwendeten Winkel ist in Abbildung 1.13 gezeigt.

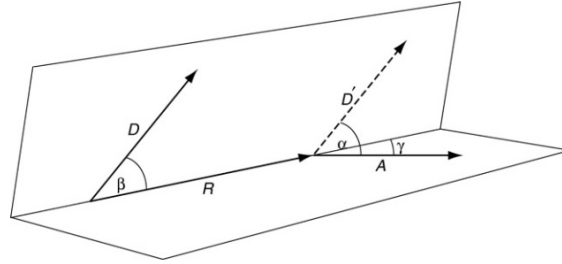


Abbildung 1.13: Schematische Darstellung der Winkel α , β und γ zur Berechnung des Orientierungsfaktors κ nach Formel 1.13. D und A sind die Donoremissions- und Akzeptorabsorptions-Dipolmomente. R ist der Abstand zwischen beiden Chromophoren. Die Winkel α , β und γ beschreiben die räumliche Ausrichtung zueinander (Abbildung modifiziert übernommen von Szöllosi et al., 2006).

$k_{F,D}$ in Gleichung 1.12 bezeichnet die normale Ratenkonstante der Donorfluoreszenz in Abwesenheit strahlungsfreier Prozesse. n steht für den Brechungsindex des Mediums zwischen Donor und Akzeptor, N für die Anzahl der Moleküle pro Millimol ($\frac{1}{1000}$ der Avogadrokonstante) und R für den Abstand des Donors und Akzeptors (siehe Abbildung 1.13). Das Integral beschreibt das Überlappintegral des auf die Fläche 1 normierten Fluoreszenzspektrums des Donors $f_D(\lambda)$ und des molaren Extinktionskoeffizienten des Akzeptors $e_A(\lambda)$. Diese Integrale sind in Abbildung 1.14 schematisch für die Chromophorpaare CFP/YFP (*cyan-/yellow fluorescent protein*) und GFP/mCherry (mCherry ist ein rot fluoreszierendes Proteine) eingezeichnet.

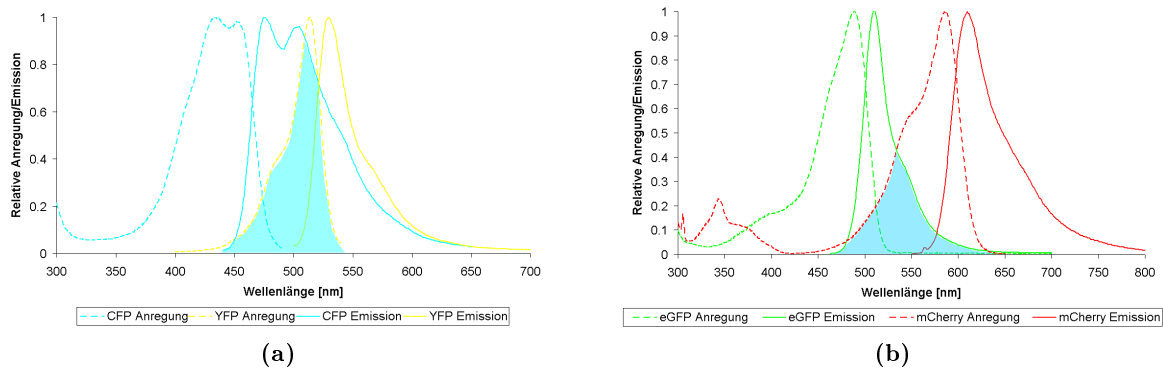


Abbildung 1.14: Spektraler Überlapp des Donoremissions- mit dem Akzeptorabsorptionsspektrum. Das Überlappintegral ist zyanfarbig gekennzeichnet. Für einen quantitativen Vergleich von (a) und (b) müssen flächennormierte Spektren verwendet werden. (a): Überlapp für die Verwendung von CFP- und YFP-Fluoreszenzproteinen (Quelle der Spekten: Invitrogen, 2011a,b) (b): Überlapp für die Verwendung von GFP- und mCherry- Fluoreszenzproteinen (Quelle der Spekten: Tsien-Laboratory, 2011)

Somit ergibt sich aus Gleichung 1.11 mit Gleichung 1.12 und der Quanteneffizienz des Donors gemäß Gleichung 1.9 für die Effizienz des FRET:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (1.14)$$

mit dem sogenannten Försterradius R_0 :

$$R_0^6 = \frac{9\kappa^2(\ln 10)Q_D}{128\pi^5 n^4 N} \int f_D(\lambda) e_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1.15)$$

R_0 bezeichnet den Abstand, bei welchem die Transfereffizienz von Donor auf Akzeptor 50 % beträgt. Wie in Gleichung 1.14 zu sehen, hängt E mit der sechsten Potenz vom Abstand R ab. Somit fällt E bei Werten für $R > R_0$ sehr schnell ab und beträgt z.B. bei einem Abstand von $R = 1,63 R_0$ nur noch 5 % des Ausgangswertes.

Wie Gleichung 1.15 zeigt, hängt E außerdem von (1) der Orientierung der beiden Chromophore (beschrieben durch κ), (2) der Quanteneffizienz des Donors in Abwesenheit des Akzeptors (beschrieben durch Q_D) und (3) dem Überlapp des Donor-Emissionsspektrums mit dem Akzeptor-Absorptionsspektrum (beschrieben durch das Integral) ab. Der Orientierungsfaktor κ (durch Formel 1.13 definiert) kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. 0 entspricht einer Orientierung, bei der die Dipolmomente des Donors und Akzeptors senkrecht zueinander stehen. Bei einem Wert von 1 sind die Dipole parallel nebeneinander und bei einem Wert von 4 parallel übereinander (kollinear) ausgerichtet. Wenn die Donor- und Akzeptordipole alle Orientierungen im Substrat (isotrope Bedingung) in einer kurzen Zeit verglichen zur Transferzeit (dynamische Mittelung Bedingung) einnehmen, so beträgt der Mittelwert für $\kappa = 2/3$ (Dale et al., 1979; Förster, 1965a). Unter welchen experimentellen Bedingungen dies der Fall ist, und wie stark die Werte in der Realität abweichen, wurde in der Literatur viel diskutiert. In Lösungen trifft diese Näherung oft gut zu. Für Fluoreszenzproteine lässt sich dies im Allgemeinen jedoch nicht behaupten. Dies liegt daran, dass die Chromophore ziemlich fest im fluoreszierenden Protein eingebunden sind und deren Ausrichtung, durch spezifische Interaktionen, nicht beliebig ist (zusammengefasst von Clegg, 2009).

Sun et al. (2011) zeigten tabellarisch den Försterradius R_0 für die Kombination verschiedener, in der biologischen Anwendung gebräuchlicher, Fluoreszenzproteinpaarungen. Bei diesen Rechnungen nahmen sie für alle Paare einen Brechungsindex von $n = 1,4$ und einen Orientierungsfaktor von $\kappa = 2/3$ an. Die resultierenden Werte für den Försterradius R_0 liegen alle im Bereich von 4,5 nm bis 6,4 nm. Somit ist FRET nur dann zu messen, wenn der Abstand der beiden Chromophore im Bereich von wenigen Nanometern liegt, da die Effizienz E des FRET-Prozesses, bei steigendem Abstand, mit der sechsten Potenz sehr schnell abfällt. Aus diesem Grund wird das Detektieren von FRET verwendet, um sehr kleine Abstände zwischen Molekülen, und somit die Proteininteraktion zu messen. Genau genommen wird aber nicht die Interaktion an sich gemessen, sondern lediglich, ob die beiden Chromophore nah genug beieinander liegen, so dass FRET stattfinden kann.

1.4.2 Methoden zur Detektion des Förster-Resonanzenergietransfers

Es gibt verschiedene Methoden FRET zu detektieren. Sie lassen sich wie folgt gruppieren:

- Messung der sensibilisierten Emission über das **2-Farbenverhältnis**: Wenn FRET auftritt, verringert sich die Fluoreszenzintensität des Donors und die des Akzeptors steigt an.
- **Photobleichen** des Akzeptors: Durch das Photobleichen des Akzeptors wird dessen Akzeptoreigenschaft zerstört und somit der FRET-Prozess unterbunden. Dadurch wird die Fluoreszenzintensität des Donors erhöht.
- Messung der **Fluoreszenzlebenszeit** des Donors: Durch den zusätzlichen Zerfallsweg über FRET verkürzt sich die Fluoreszenzlebenszeit des Donors.
- **Spektrale Messmethode**: Ähnlich zur 2-Farbenverhältnis-Messung wird auch hier die verringerte Fluoreszenzintensität des Donors und die erhöhte des Akzeptors bestimmt, allerdings nicht für zwei, durch die Fluoreszenzfilter festgelegte Wellenlängenbereiche, sondern mit genauer spektraler Auflösung.
- Bei linear polarisierter Anregung des Donors wird die **Polarisationsanisotropie** der Emission bestimmt.

Die wohl bekannteste Methode FRET zu detektieren ist die 2-Farbenverhältnis-Methode. Da der Donor einen Teil seiner Anregungsenergie auf den Akzeptor überträgt, gibt der Donor weniger Photonen über Fluoreszenz frei, der Akzeptor jedoch mehr. Somit ist es fast intuitiv, das Fluoreszenzsignal des Donors und des Akzeptors zu messen und diese zu vergleichen. Hieraus ergeben sich jedoch gravierende Probleme. Wie zuvor beschrieben, muss das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappen. Je größer diese Überlappung, umso stärker ist die FRET-Effizienz E . Allerdings ergibt sich daraus fast zwingend, dass das Emissionsspektrum des Donors auch etwas mit dem Emissionsspektrum des Akzeptors überlagert ist. Somit ist es quasi unmöglich die reine Fluoreszenz des Akzeptors zu messen. Das Fluoreszenzlicht des Donors wird immer einen Beitrag zum gemessenen Signal des Akzeptors liefern. Dies wird als *emission crosstalk* (Emissions-Einstreuung) bezeichnet. Des Weiteren ist es praktisch unmöglich nur den Donor zur Fluoreszenz anzuregen, da das Anregungsspektrum eines Fluoreszenzproteins, also auch des Akzeptors, zu niedrigen Wellenlängen meist nur flach abfällt. Dies ist natürlich abhängig von den spektralen Eigenschaften der Fluoreszenzproteine und der gewählten Filter bzw. Laser. In der Praxis jedoch ist es meist nicht vermeidbar neben dem Donor, auch den Akzeptor etwas anzuregen. Dies wird als *excitation crosstalk* (Anregungs-Einstreuung) bezeichnet. Zusätzlich kommt erschwerend hinzu, dass alle gemessenen Fluoreszenzsignale, und damit auch beide soeben beschriebene Effekte, stark von der Konzentration der Fluoreszenzproteine abhängig sind. Da diese, insbesondere in biologischen Proben (bei transient transfizierten Zellen), sehr stark schwanken können, sind aufwendige Kontrollmessungen und Normierungen nötig, was diese Methode fehleranfällig macht.

Beim Photobleichen des Akzeptors werden durch sehr helle Lichteinstrahlung im geeigneten Wellenlängenbereich nur die fluoreszierenden Eigenschaften des Akzeptors zerstört. Dadurch kann der FRET-Prozess vom Donor auf den Akzeptor nicht mehr stattfinden, weshalb der Donor nach dem Bleichen stärker fluoresziert. Nachteil dieser Methode ist, dass das Experiment nur einmal durchgeführt werden kann. Ist der Akzeptor einmal zerstört, so lassen sich dessen fluoreszierende Eigenschaften nicht wieder herstellen. Somit ist das Akzeptorbleichen für mehrere Messungen an lebenden Zellen über z.B. einen längeren Zeitraum völlig ungeeignet.

Bei der Fluoreszenzlebenszeitmessung wird die Lebenszeit der Donorfluoreszenz, typischerweise einige ns, gemessen. Findet FRET statt, so ist diese verkürzt. Diese Methode ist sehr fehlerrobust

und wird deshalb oft verwendet. Allerdings erfordert das Messprinzip sehr komplexe und damit sehr teure Messapparaturen. Abhängig vom exakten Verfahren ist diese Methode teilweise relativ langsam, was sie für sehr schnelle Lebendzellmessungen ungeeignet machen kann.

Bei der Spektralen Bildgebung werden nicht nur, wie bei der 2-Farbenverhältnis-Methode, zwei Wellenlängenbereiche für den Donor und Akzeptor gemessen, sondern die Intensitäten für das gesamte Spektrum werden bestimmt. Dadurch ist es möglich Fehlerquellen wie Emissions-Einstreuung durch nachträgliche Datenprozessierung zu eliminieren. Da die Anzahl der Mikroskope, die mit einem solchen System ausgestattet sind, ansteigt, wird diese Methode in Zukunft sicher an Bedeutung gewinnen. Abgesehen von den nötigen Prozessierungsschritten, bringt diese Methode wenige Nachteile mit sich. Jedoch ist sie durch die spektrale Aufnahme auch vergleichsweise langsam.

Eine weitere Möglichkeit FRET zu detektieren, ist die Messung der Polarisationsanisotropie der Emission bei linear polarisierter Anregung. Wie in Abbildung 1.15a schematisch verdeutlicht wird hierbei nur ein Teil der beliebig orientierten Fluoreszenzmoleküle angeregt, nämlich diejenigen, welche die richtige Ausrichtung besitzen. Die Polarisationsanisotropie der Emission wird gemessen. Wie in Abbildung 1.15b gezeigt, wird diese durch zwei Prozesse bestimmt: (1) Das Fluoreszenzprotein rotiert während seiner Fluoreszenzlebenszeit, oder (2) Förster Resonanzenergietransfer von dem angeregten Donor auf ein räumlich anders orientiertes Akzeptormolekül findet statt. Da Fluoreszenzmoleküle aufgrund ihrer Größe während ihrer Fluoreszenzlebenszeit kaum rotieren, kann Punkt (1) vernachlässigt werden. Somit lässt eine Depolarisation der Emission, die einer Reduktion der Polarisationsanisotropie entspricht, auf FRET schließen. Werden zur Bestimmung der Polarisationsanisotropie die vertikale und die horizontale Polarisationskomponente gleichzeitig bestimmt, ist diese Methode sehr schnell und praktisch nur durch die Fluoreszenzintensität und die Sensitivität des Messsystems beschränkt. Außerdem lässt sich nahezu jedes System relativ preisgünstig für derartige Messungen modifizieren. Der größte Vorteil ist aber, dass diese Methode die Fehlinterpretation von fälschlich positiv bewerteten Ergebnissen verhindert, da ungewünschte Effekte wie Emissions-Einstreuung und Anregungs-Einstreuung die Polarisationsanisotropie erhöhen, aber nur eine Verringerung auf den FRET-Prozess hindeutet. Somit ist diese Methode gut geeignet um Bedingungen zu bestimmen, bei denen FRET stattfindet. Tritt aber keine Reduktion der Polarisationsanisotropie auf, so lässt sich keinesfalls ausschließen, dass FRET stattgefunden hat. Sind Donor und Akzeptor nämlich genau parallel ausgerichtet, so lässt sich keine Verringerung der Polarisationsanisotropie detektieren.

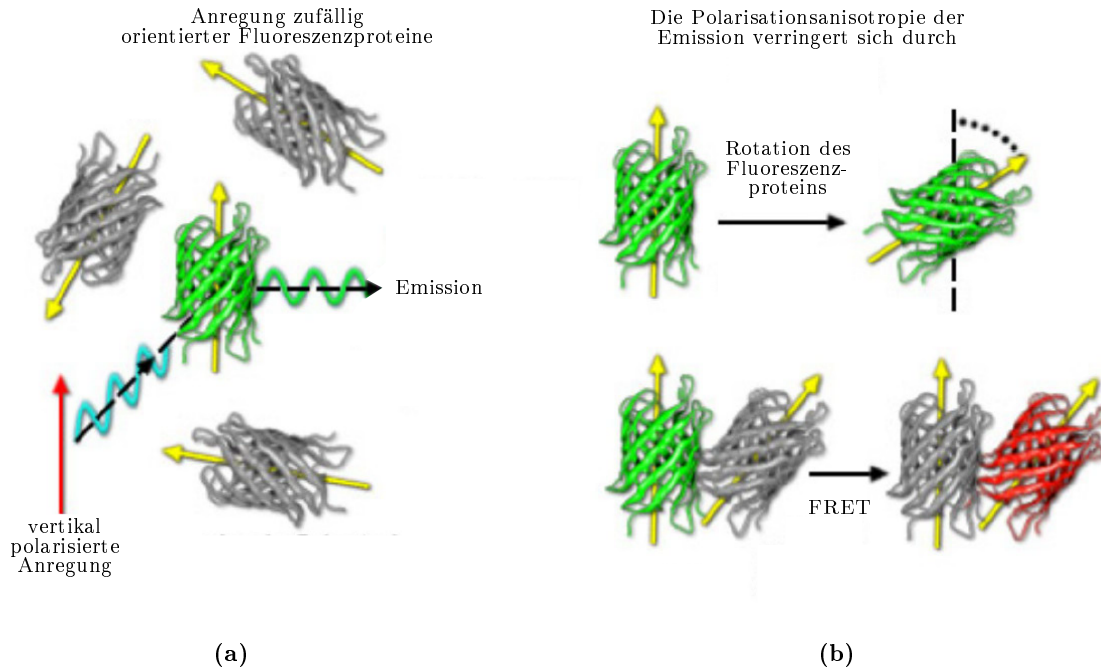


Abbildung 1.15: Prinzip der FRET Messung über Polarisationsanisotropie. (a): Mit linear polarisiertem Licht werden nur die Fluoreszenzmoleküle selektiv angeregt, die parallel zur Polarisation des Lichtes ausgerichtet sind. (b): Das angeregte Fluoreszenzmolekül kann die absorbierte Energie selbst als Fluoreszenz abgeben. Eine Rotation währenddessen würde die Polarisationsanisotropie des Emissionslichtes reduzieren (oben dargestellt). Aber auch durch FRET auf ein anderes Fluoreszenzprotein, das nicht exakt parallel zum ersten ausgerichtet ist, verringert sich die Polarisationsanisotropie (unten dargestellt) (Abbildungen modifiziert übernommen von [Kremers et al. \(2011\)](#)).

1.4.3 Fluoreszenzpolarisationsanisotropie

Der Begriff der Polarisationsanisotropie wurde, wie [Jablonski \(1960\)](#) schrieb, bereits 1958 von ihm eingeführt. Demnach ist die Polarisationsanisotropie r , bei vertikal polarisierter Anregung, definiert durch:

$$r = \frac{I_{ver} - I_{hor}}{I_{ver} + 2I_{hor}} \quad (1.16)$$

I_{ver} bezeichnet die vertikale Komponente und I_{hor} die horizontale Komponente der Fluoreszenzemission. In isotropen Lösungen, ohne jede Vorzugsrichtung der Chromophore, sind diese in drei Dimensionen symmetrisch um die vertikale Achse der Anregung verteilt. Somit ist, bei Mittelung über sämtliche Moleküle, die dritte, nicht sichtbare Komponente, die in Richtung der Lichteinstrahlung liegt, gleich zu der horizontalen. Aus diesem Grund bezeichnet der Nenner aus Gleichung 1.16 die Gesamtintensität ([Axelrod, 1989](#)).

Mittelt man die räumliche Verteilung der angeregten Zustände, nach linear polarisierter Anregung, über den gesamten Raum, so kann die Polarisationsanisotropie beschrieben werden durch ([Förster, 1965b](#)):

$$r = \frac{3}{5} \cos^2 \alpha - \frac{1}{5} \quad (1.17)$$

Hierbei ist α der Winkel zwischen dem Absorptions- und dem Emissionsdipolmoment. Sind diese gleich ausgerichtet beträgt $\alpha=0^\circ$ und es ergibt sich ein maximaler Wert für r von 0,4. Liegen sie senkrecht zueinander, so ergibt sich der minimal mögliche Wert für r von -0,2 (Förster, 1965b). Bei Mehrphotonenanregung ist die Verteilung der angeregten Zustände schmaler, weshalb die Anisotropie auch Werte größer als $r=0,4$ annehmen kann (Lakowicz et al., 1992; Gryczynski et al., 1995).

Alle bis hier beschriebenen Gesetzmäßigkeiten sind gültig für Chromophore, die sich während ihrer Fluoreszenzlebenszeit nicht bewegen. Rotieren sie, so verringert sich die Polarisationsanisotropie mit der Rotationsgeschwindigkeit. Dies kann man sich in zeitlich hochaufgelösten Messungen zu Nutzen machen (Levitt et al., 2009). Des Weiteren kann sich die gemessene Polarisationsanisotropie auch mit der numerischen Apertur der verwendeten Objektive ändern. Axelrod (1979, 1989) stellte in den Abbildungen 1 und 2 seiner Publikation die Ergebnisse aus theoretischen Rechnungen dar, die zeigen, wie die Polarisationsanisotropie vom Winkel α , der numerischen Apertur des Objektivs und der Rotationsrate des Chromophors abhängt. Im Allgemeinen nimmt r mit zunehmendem Winkel α , steigender Rotationsdiffusionsrate des Chromophors und steigender numerischer Apertur ab.

1.4.4 homo-FRET

Wie Förster (1965a) und Weber (1954) schon berichteten, findet FRET nicht nur zwischen Chromophoren unterschiedlicher Art, sondern auch zwischen gleichartigen statt. Dieser Vorgang wird in der Literatur meist als homoFRET bezeichnet. Dies hat den Vorteil, dass sich die oft sehr schwierige und aufwendige Protein-Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen stark vereinfacht, da nur eine Art der Markierung nötig ist. Des Weiteren ermöglicht diese Methode z.B. die Anzahl an Fluorophoren in kleinen Anhäufungen zu bestimmen (Bader et al., 2011; Chan et al., 2011). Das verwendete Fluorophor sollte eine geringe Stokes-Verschiebung aufweisen, so dass der Überlapp des Anregungs- mit dem Emissionsspektrum möglichst groß ist.

Da der Donor und der Akzeptor spektroskopisch identisch sind, kann homoFRET nur mit der Polarisationsanisotropiemethode gemessen werden (Gautier et al., 2001; Jares-Erijman und Jovin, 2003; Squire et al., 2004; Chan et al., 2011).

Material und Methoden

2.1 Kultivierung und Behandlung der Zellen

Die Zellen wurden im Brutschrank (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) in 75 cm² oder 25 cm² großen Kulturflaschen des Herstellers BD Bioscience (Le Pont De Claix, Frankreich) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich. Bei vollständiger Konfluenz der Zellen wurden diese passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen und der Boden mit 1 ml Trypsin (0,05 % Trypsin der Firma PAN, Aiderbach und 0,1 % EDTA in PBS) benetzt. Diese Trypsinlösung wurde abgezogen, weitere 3 ml hinzugegeben und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Durch sanftes Klopfen und Durchspülen mit der Pipette wurden die Zellen abgelöst und vereinzelt. Die Trypsinreaktion wurde mit dreifacher Menge an Medium abgestoppt. Die Zellkonzentration in der vorliegenden Zellsuspension wurde mit dem Zellzähler Z2 Coulter Counter (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) bei einer Verdünnung von 1:50 bestimmt. Alle Zellen wurden regelmäßig auf Mykoplasmen untersucht.

Die im Folgenden verwendete **PBS** (phosphatgepufferte Salzlösung) setzt sich wie folgt zusammen: 8,0 g/l NaCl (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 0,2 g/l KCl (MERCK, Darmstadt, Deutschland), 1,44 g/l Na₂HPO₄ (MERCK, Darmstadt, Deutschland), 0,24 g/l KH₂PO₄ (MERCK, Darmstadt, Deutschland).

2.1.1 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

- **U2OS**: Humane Osteosarkomazellen. Diese Zellen wurden in DMEM Medium (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) (4,5 g/l Glucose und 110 mg/l Na-pyruvat) mit 10 % FCS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) kultiviert. Die Zellen stammen von ATCC (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland).
- **U2OS-NBS1-GFP**, **U2OS-MDC1-GFP**, **U2OS-ATR-GFP** und **U2OS-53BP1-GFP**: Humane Osteosarkomazellen jeweils stabil transfiziert mit NBS1-2GFP ([Lukas et al., 2003](#)), MDC1-GFP, ATR-GFP oder 53BP1-GFP. Diese Zelllinien wurden von Claudia Lukas, Danish Cancer Society, Kopenhagen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden in DMEM Medium (4,5 g/l Glucose und 110 mg/l Na-pyruvat) mit 10 % FCS kultiviert.

- **Hela:** Diese humanen Zervixkarzinomzellen wurden in RPMI Medium (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) mit 10 % FCS kultiviert. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Nuri Gueven (The Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia) zur Verfügung gestellt.
- **Hela-H2B-GFP/mCherry-H2B:** Humane Zervixkarzinomzellen mit H2B-GFP und mCherry-H2B stabil transfiziert. Die Zellen wurden in DMEM Medium (4,5 g/l Glucose und 110 mg/l Na-pyruvat) mit 10 % FCS kultiviert. Diese Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Saskia Hutten aus dem Labor von Prof. Angus Lamond (University of Dundee, Dundee, Schottland) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Zellaussaat

Zur Zellaussaat wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, mit Trypsin vom Boden der Kulturf Flasche abgelöst und vereinzelt. Anschließend wurde die gewünschte Menge an Zellen auf das entsprechende Trägermaterial aufgetropft. Das Trägermaterial wurde zuvor mit 70 % Ethanol sterilisiert und unter sterilen Bedingungen getrocknet.

Für Experimente am Strahlplatz-Mikroskop

Für Proteinrekrutierungsmessungen mit dem Strahlplatz-Mikroskop wurden die Zellen auf Polycarbonatfolie des Herstellers Goodfellow GmbH (Bad Nauheim, Deutschland) mit einem Durchmesser von 18 mm und einer Dicke von 40 μm oder auf lumox Folie 25 des Herstellers In Vitro Systems & Services (Göttingen, Deutschland) mit einem Durchmesser von 18 mm und einer Dicke von 25 μm ausgesät. Bei Bestrahlung mit C-Ionen wurden \varnothing 18 mm Deckgläser # 0 (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) als Trägermaterial verwendet. Es wurden entweder zwei Tage vor dem Experiment 60.000 Zellen in 0,5 ml Medium oder ein Tag vor dem Experiment 90.000 Zellen in 0,5 ml Medium auf das Trägermaterial in Petrischalen (\varnothing 35 mm, Nunc, Roskilde, Dänemark) ausgesät. Nach ca. 5 h wurde das Medium auf 2 ml aufgefüllt.

Für FRAP-Messungen

Für FRAP-Messungen wurden die Zellen auf \varnothing 40 mm runden Deckgläsern (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) in Petrischalen (ca. \varnothing 42 mm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Hierbei wurden entweder 2 ml Zellsuspension mit 250.000 Zellen zwei Tage vor dem Experiment oder 500.000 Zellen in 2 ml ein Tag vor dem Experiment ausgesät. Nach ca. 5 h wurde das Medium auf 5 ml aufgefüllt.

Für Immunzytochemische Färbungen

Zellen für die Immunzytochemie wurden auf 24 mm x 24 mm großen Deckgläsern (VWR International GmbH, Darmstadt) in Petrischalen (\varnothing 35 mm, Nunc, Roskilde, Dänemark) ausgesät. Hierzu wurden 125.000 Zellen in 2 ml Zellsuspension zwei Tage oder 250.000 Zellen in 2 ml Zellsuspension ein Tag vor dem Experiment ausgesät.

Für Experimente am Microbeamenaufbau

Für Microbeamexperimente wurden die Zellen in speziellen Kammern auf Polypropylenfolie (Goodfellow GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) mit einer Dicke von 4 μm ausgesät. Die Kammern wurden vorher in 70%igem Ethanol sterilisiert. Die Folien wurden zusätzlich mit BD Cell-

Tak Lösung (BD, Heidelberg, Deutschland) mit einer Konzentration von $1,37 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ in $0,1 \text{ M NaHCO}_3$ (pH 8, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) behandelt. Es wurden 20.000 Zellen in $150 \mu\text{l}$ ein Tag vor dem Experiment ausgesät. Nach ca. 5 h wurde das Medium auf $300 \mu\text{l}$ aufgefüllt.

Für FRET-Experimente

Die Zellaussaat für FRET-Messungen erfolgte auf $\varnothing 30 \text{ mm}$ runden Deckgläsern No 1 (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland) in $\varnothing 35 \text{ mm}$ Petrischalen. Es wurden entweder 150.000 Zellen in 2 ml zwei Tage vor dem Experiment, oder 300.000 Zellen in 2 ml ein Tag vor dem Experiment ausgesät.

2.1.3 Transfektion der Zellen

Für die Transfektion mit **JetPrime** (Polyplus-transfection Inc., New York, USA) Reagenz wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion auf $\varnothing 30 \text{ mm}$ Glasplättchen in $\varnothing 35 \text{ mm}$ Petrischalen ausgesät, so dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von 60-80 % hatten. $200 \mu\text{l}$ des JetPrime Puffers wurden mit $2 \mu\text{g}$ der entsprechenden DNA und $4 \mu\text{l}$ des JetPrime DNA Transfection Reagenz gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dieser Transfektionsansatz auf den Zellen verteilt. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank weitere 24 h bis zum Experiment inkubiert.

Für die Transfektion mit **Lipofectamine2000** (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) wurden die Zellen ein bis zwei Tage vorher auf $\varnothing 30 \text{ mm}$ Glasplättchen in $\varnothing 35 \text{ mm}$ Petrischalen ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von ca. 90 % hatten. $2 \mu\text{g}$ der DNA wurden in $200 \mu\text{l}$ Gibco Opti-MEM Medium (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) gegeben. In einem zweiten Ansatz wurde $195 \mu\text{l}$ Gibco Opti-MEM Medium mit $5 \mu\text{l}$ Lipofectamine2000 Reagenz gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden beide Ansätze zusammengegeben und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der Zellen abgenommen und nach 2-maligem Waschen mit PBS, $1,5 \text{ ml}$ des Opti-MEM Mediums zu den Zellen gegeben. Nach den 20 min Inkubationszeit wurde die Mischung beider Ansätze auf die Petrischale verteilt. Die Zellen wurden 24 h bis zum Experiment im Brutschrank inkubiert, wobei ca. 5 h nach der Transfektion ein Mediumwechsel gegen das normale Medium der Zellen durchgeführt wurde.

Für die Transfektion mit dem **Amaxa Nucleofector** wurden die Zellen wie zuvor beschrieben mittels Trypsin abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe der dreifachen Menge an BSA (Karl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) (5 g/l) in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (Katalognr. 1815, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gestoppt. Eine entsprechende Menge der Zellsuspension mit 10^6 Zellen wurde bei 107 g für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in $100 \mu\text{l}$ der Amaxa Cell Line Nucleofector Solution V mit Supplement 1 (beides Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V) gelöst. $2 \mu\text{g}$ des Plasmids wurden hinzugegeben. $100 \mu\text{l}$ der Lösung wurden in die speziellen Amaxa Küvetten gegeben und mit dem Transfektionsprogramm X-01 im Nucleofector I Apparat (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, USA) behandelt. Die Zellsuspension wurde mit den speziellen Amaxa Pipetten aus der Küvette entnommen und in 6 ml Kulturmedium gegeben. Es wurden jeweils 3 ml auf zwei $\varnothing 40 \text{ mm}$ runden Glasplättchen in Petrischalen (ca. $\varnothing 42 \text{ mm}$) ausgesät.

Folgende **Plasmide (DNA)** wurden transfiziert:

- ATM-YFP: Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Sergei Kozlov (The Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia). Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamine2000.
- Cerulean: Zur Verfügung gestellt von [Koushik et al. \(2006\)](#). Beschrieben von [Rizzo et al. \(2004\)](#).
- Venus: Zur Verfügung gestellt von [Koushik et al. \(2006\)](#). Beschrieben von [Nagai et al. \(2002\)](#).
- C5V: Zur Verfügung gestellt und beschrieben von [Koushik et al. \(2006\)](#).
- C5A: Zur Verfügung gestellt und beschrieben von [Koushik et al. \(2006\)](#).
- GFP: Für die FRAP-Experimente: GFPmut1 beschrieben in [Cormack et al. \(1996\)](#) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Scott (The Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia). Die Transfektion erfolgte mit Amaxa. Für FRET-Experimente wurde pmaxGFP (Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland) verwendet. Die Transfektion erfolgte mit dem JetPrime Reagenz.
- mCherry: Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Sergei Kozlov (The Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia).
- pByffu: Das Plasmid wurde von [Tramier et al. \(2006\)](#) hergestellt und charakterisiert. Für diese Experimente wurde es freundlicherweise von Sergei Kozlov (The Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia) zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Fixierung der Zellen

Das Medium der Zellen wurde abgenommen. Anschließend wurden die Zellen einmal kurz mit PBS abgewaschen und mit 2 %-Paraformaldehyd (PFA) (SIGMA, Steinheim, Deutschland) in PBS bei Raumtemperatur für 15 min fixiert. Danach wurden die Zellen für 10 min mit 0,5 % Triton X-100 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) in PBS permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für 3 min wurden die Proben zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 20 min in 0,5 % BSA in PBS inkubiert. Bei nicht sofortiger Färbung wurden die Proben in 0,5 % BSA bei 4°C gelagert.

2.1.5 Immunzytochemische Färbung der Zellen

Nachdem die Zellen fixiert waren, wurden sie immunzytochemisch gefärbt. Der spezifische Erstantikörper wurde entsprechend seiner Vorgaben (siehe Tabelle 2.1) in PBS mit 0,5 % BSA verdünnt. Das Glasplättchen mit den Zellen wurde kopfüber auf einen Tropfen der Antikörperlösung (50 µl auf Parafilm) gelegt. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Nun folgte die Färbung mit dem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper. Auch dieser wurde entsprechend den Angaben in Tabelle 2.2 in PBS mit 0,5 % BSA verdünnt. Die Proben wurden mit 50 µl dieser Lösung für 30 bis 45 min bei Raumtemperatur inkubiert, und anschließend erneut zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Um ein Austrocknen zu vermeiden, wurden die Proben bei der Primär- und Sekundärantikörperinkubation in einer feuchten Kammer gelagert. Die Färbung der DNA erfolgte anschließend mit einer DAPI Lösung (4',6-diamidino-2-phenylindole) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) von 1 µg/ml in PBS für 15 bis 20 min bei Raumtemperatur. Nach kurzem Spülen mit PBS wurden die Proben kurz in entionisiertes Wasser getaucht und mit Vectrashield Mounting

Medium (Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.) eingedeckelt. Ab der Zugabe des sekundären Antikörpers wurden die Proben vor Licht geschützt, um unnötiges Bleichen der Fluorophore zu vermeiden.

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten primären Antikörper.

Antikörper	Hersteller	aus Spezies isoliert	in Verdünnung verwendet
Anti-phospho-Histon H2A.X (Ser139) clone JBW301	Millipore, Temecula, Kanada	Maus	1:500
NBS1 p95 (ab23996)	Abcam, Cambridge, UK	Kaninchen	1:300
MDC1	Dr. Nuri Gueven ^a	Schaf	1:400

^aThe Queensland Institute of Medical Research, Brisbane

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten sekundären Antikörper.

Antikörper	Hersteller	aus Spezies isoliert	bindet Spezies	in Verdünnung verwendet
Alexa Fluor 488	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA	Ziege	anti-Kaninchen	1:400
Alexa Fluor 568	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA	Ziege	anti-Maus	1:400
Alexa Fluor 568	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA	Esel	anti-Schaf	1:400
Atto 647N (50185)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Ziege	anti-Maus	1:200

2.1.6 Inhibitorbehandlung der Zellen

Doppelinhibition von ATM und DNA-PK

Zur ATM Kinaseinhibition wurde der spezifische Inhibitor KU55933 (Calbiochem, San Diego, California, USA) verwendet ([Hickson et al., 2004](#)). Hierzu wurde zunächst eine Stocklösung von 2 mg KU55933 in 0,5 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) (DMSO für Zellkultur, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) angesetzt. Die Inkubation der Zellen in dem entsprechenden Kulturmedium erfolgte nach Literaturangabe ([Chen et al., 2007](#)) mit einer Inhibitorkonzentration von 10 μ M. Analog wurde für den DNA-PK Inhibitor IC86621 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA) eine Stocklösung von 50 mM in DMSO hergestellt. Dieser Inhibitor wurde mit einer Konzentration von 200 μ M eingesetzt. Die Zellen wurden ab ein bis zwei Stunden vor Bestrahlung mit beiden Inhibitoren inkubiert. Auch nach der Bestrahlung wurden die Zellen weiterhin unter Inhibition gehalten.

CK2-Inhibition

Für die CK2-Inhibition wurde der Inhibitor TBB (4,5,6,7-Tetrabromo-2-azabenzimidazole) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA) verwendet. Es wurde eine Stocklösung von 50 mM in DMSO angesetzt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 300 μ M ab fünf Stunden vor der Bestrahlung inkubiert. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen weiterhin unter Inhibition gehalten.

Histondeazetylase-Inhibitor TSA

Für die Inhibition der Histondeazetylase wurde TSA (Trichostatin A) des Herstellers Cayman (Michigan, USA) verwendet. Es wurde zunächst eine Stocklösung mit Konzentration von 1,1 mM in DMSO hergestellt. In den Experimenten wurde TSA mit einer Konzentration von 0,66 μ M verwendet.

ATP-Entzug

Zum ATP-Entzug wurden die Zellen mit 10 mM Na-Azid (Sigma, St. Louis, USA) und 50 mM 2Deoxyglukose (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA) behandelt ([Llères et al., 2009](#)).

2.2 Zellbestrahlung

2.2.1 Röntgenbestrahlung

Die Zellen wurden mit einer Röntgen-Röhre der Firma GE Sensing & Inspection Technologies (Ahrensburg, Deutschland) Typ Isovolt 320/13 bestrahlt. Die Röhre wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 250 kV und einem Strom von 16 mA betrieben. Das Austrittsfenster besteht aus 7 mm dickem Beryllium. Zusätzlich ist ein Filtersystem aus 1 mm dickem Kupfer und 1mm dickem Aluminium eingebaut. Mit einem Dosimeter des Typs SN4 (PTW, Freiburg, Deutschland) wurde die Dosis bestimmt. Das Filtersystem ist für den niedrigen Energiebereich (unter ca. 40 keV) undurchlässig. Höherenergetische Photonenbestrahlung hat einen LET von wenigen keV/ μ m ([ICRU, 1970](#); [Makrigiorgos und Waker, 1986](#); [Hall und Giaccia, 2006](#)). Aus diesem

Grund wurde der LET der Röntgenbestrahlung, zum Vergleich mit der Ionenbestrahlung, vereinfacht mit $1 \text{ keV}/\mu\text{m}$ angegeben. Die Zellen wurden mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt.

2.2.2 Ionenbestrahlung am UNILAC der GSI

Es wurden Schrägbestrahlungen durchgeführt bei denen der Zellrasen in einem Winkel von ca. 15° zum einfallenden Strahl positioniert war. Proben für Immunfluoreszenzfärbungen wurden in ein spezielles, mit Medium gefülltes Magazin eingesetzt. Ein Greifer hob jeweils eine der max. 9 Proben für nur wenige Sekunden zur Bestrahlung aus dem Magazin und setzte sie gleich wieder zurück. Dieser Aufbau ist in Abbildung 2.1a gezeigt.

Die Proben für die FRAP- und FRET-Messungen wurden nicht mit dem Magazinaufbau bestrahlt. Sie wurden für die Bestrahlung kurz aus dem Medium genommen und auf einer speziellen Halterung im 15° Winkel aufgebracht (siehe Abbildung 2.1b) (Jakob und Taucher-Scholz, 2006). Nach der Bestrahlung wurde die Probe wieder in das Medium zurückgelegt. Die Zeitspanne, in der sich die Proben auf der Halterung befanden, war durch den gesicherten Zugang des Bestrahlungsplatzes limitiert und betrug weniger als zwei Minuten.

In allen Experimenten wurden die Zellen mit einer Fluenz von $2,0 \cdot 10^6$ bis $3,0 \cdot 10^6$ Teilchen/ cm^2 bestrahlt.

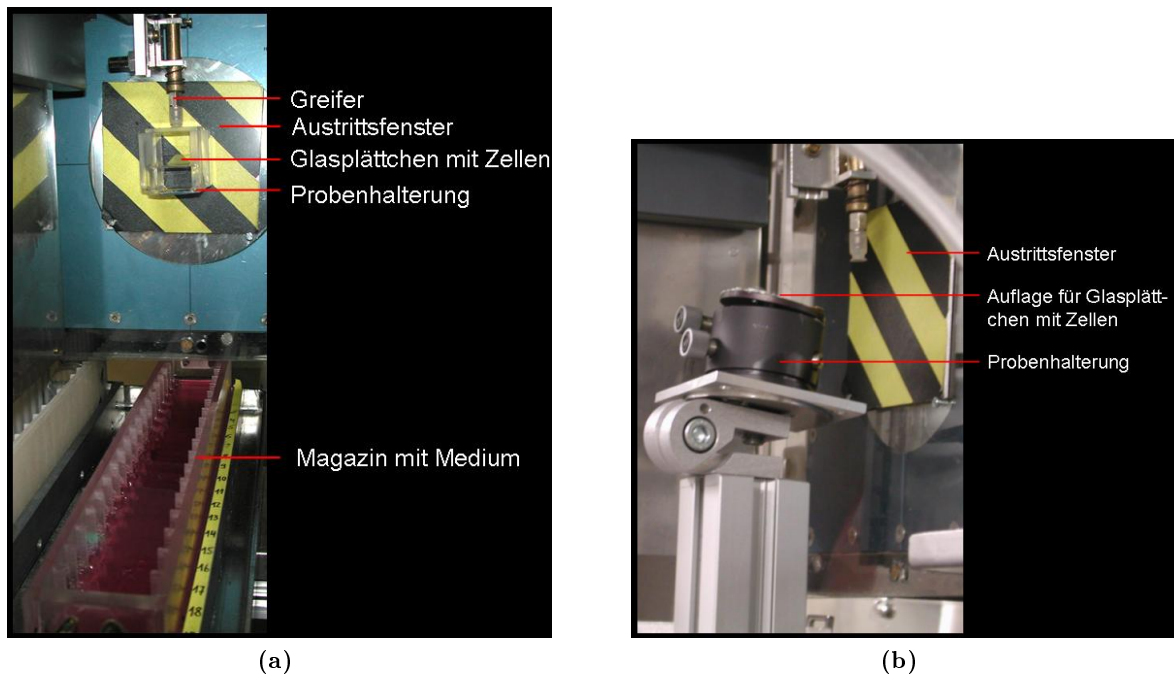


Abbildung 2.1: Zellbestrahlung am UNILAC der GSI. (a): Experimenteller Aufbau für die Ionenbestrahlung der Immunfluoreszenzproben. Das Austrittsfenster ist durch einen Ionisationskammerschutz verdeckt. Der Greifer saugt eine der Probenhalterungen aus dem Magazin an und hebt sie direkt vor das Austrittsfenster. Das Glasplättchen im Probenhalter, auf deren Unterseite sich der Zellrasen befindet, liegt in einem Winkel von ca. 15° zur Horizontalen. Nach der Bestrahlung setzt der Greifer die Probe wieder im Magazin mit Medium ab. (b): Experimenteller Aufbau für die Ionenbestrahlung der FRAP- und FRET-Proben. Das Glasplättchen wurde mit dem Zellrasen auf der Oberseite auf den Probenhalter gelegt. Dieser Aufbau wird vor dem Austrittsfenster positioniert. Unmittelbar nach der Bestrahlung wird die Probe wieder in das Medium zurückgegeben.

2.2.3 Ionenbestrahlung am Microbeamaufbau der GSI

Der Microbeamaufbau der GSI wurde von [Heiss et al. \(2006\)](#) und [Voss et al. \(2008\)](#) detailliert beschrieben. Zusammengefasst ermöglicht dieser Aufbau am UNILAC Beschleuniger der GSI, Zellen mit einer definierten Anzahl an Ionen zu bestrahlen. Hierzu können Teilchen von He- bis U-Ionen zur Bestrahlung verwendet werden. Die Energie der Ionen beträgt typischerweise 4,8 MeV/u. Die Strahlfleckgröße beträgt 700 nm x 500 nm mit einer Treffergenauigkeit von unter 1,0 μm . Die Aufnahmen erfolgten mit einem Objektiv des Herstellers Leica (Wetzlar, Deutschland) Typ N PLAN L 40 x/0,55 CORR PH2.

2.3 Mikroskopie

2.3.1 Strahlplatz-Mikroskop

Der Aufbau des Strahlplatz-Mikroskops wurde von [Jakob et al. \(2005\)](#) beschrieben. Die prinzipielle Funktionsweise ist unverändert, jedoch wurden Komponenten erneuert. Ein Olympus Mikroskop der Bezeichnung IX71 (Hamburg, Deutschland) mit einem Olympus UPlanSApo 60x 1,20 Wasserimmersionsobjektiv wurde verwendet. Wie beschrieben wurde das Mikroskop um 90 ° auf die Seite gelegt, um die Aufnahme der Zellen während der Ionenbestrahlung zu ermöglichen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte über den Monochromator Polychrome V (TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland). Das Anregungslicht wurde über einen Lichtleiter in das Mikroskop eingekoppelt. Die Bildaufnahme erfolgte mit der EM-CCD (Electron-multiplying charge-coupled device) Kamera Typ DU-888E-C00-#BV oder DV887ECS-BV (Andor Technology, Belfast, Irland) und der Aufnahmesoftware Andor IQ Version 1.10.3 im "Fast LZ" Modus. Für die Dauer der Rekrutierungsmessungen wurden die Zellen auf der Polykarbonatfolie, auf der lumox Folie 25 oder auf den Deckgläsern in speziell angefertigte Lebendzellkammern mit Kulturmedium eingelegt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.2 FRAP-Mikroskopie

Der aufgebaute FRAP-Messplatz ist in Abschnitt 3.2.1 detailliert beschrieben. Für die FRAP-Messungen wurden die Proben mit den Zellen in das Focht Chamber System 2 (FCS2) (Bioprotech Inc, Butler, USA) mit Kulturmedium eingespannt. Diese speziell entwickelte Kammer ermöglicht das Mikroskopieren von lebenden Zellen mit einer hohen Auflösung über einen langen Zeitraum. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurde Kulturmedium ohne den pH-Indikator Phenolrot verwendet.

Die einzelnen FRAP-Messungen wurden nach Gleichung 3.1 normiert. Der Zeitpunkt des Bleichens wurde auf $t=0$ gesetzt. Aus den einzelnen Kurven wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Dekonvolution der in Abbildung 3.9 gezeigten Aufnahme erfolgte mit der Software Huygens Essential (Hilversum, Niederlande).

2.3.3 FRET-Mikroskopie

Der FRET Aufbau ist detailliert in Abschnitt 3.3.2 beschrieben. Die spektralen Eigenschaften der optischen Komponenten sind im Anhang Abschnitt A.1 gezeigt. Die \varnothing 30 mm Glasplättchen mit den Zellen wurden in einer speziellen Kammer mit ca. 2 ml Kulturmedium ohne Phenolrot montiert. Während den Messungen wurden die Zellen mit einem System des Herstellers Pecon (Erbach, Deutschland) bestehend aus "Pecon tempcontrol 37-2 digital", "Heating Unit" und "CO₂ controller" mit 5 % CO₂ begast und auf 37 °C temperiert.

2.3.4 Mikroskopie der immunzytochemisch gefärbten Zellen

Die immunzytochemisch gefärbten Zellen wurden am Spinning-Disk konfokalen Mikroskop untersucht, an dem auch die polarisationsanisotropiebasierten FRET Messungen durchgeführt wurden. Der Aufbau ist detailliert in Abschnitt 3.3.2 beschrieben. Für die Aufnahmen der immunzytochemisch gefärbten Zellen wurden der Polarisator und der Polarisationsstrahlteiler aus dem Strahlengang gefahren. Es wurde ein Bildstapel mit einem Abstand von 200 nm oder 300 nm zwischen den Ebenen durch die Zellen aufgenommen.

2.4 Datenanalyse und Bildbearbeitung

2.4.1 Fitten der FRAP Daten

Alle mathematischen Fitanalysen wurden mit Wolfram Mathematica Version 6.0.1.0 durchgeführt. Die laplacetransformierten Lösungen nach Gleichungen 3.13 und 3.21 wurden mit Hilfe des "NumericalInversion" Paket Version 1.0 (Arnaud Mallet, University of Mauritius) mit der Stehfestmethode (Stehfest, 1970) rücktransformiert. Die FRAP Kurven wurden mit Hilfe des "Nonlinear Regression" Paket Version 3.1 (John M. Novak und E.C. Martin, Wolfram Research) gefittet. Hierbei wird der Fit mit der kleinsten quadratischen Abweichung (least square fit) ermittelt und eine statistische Regressionsanalyse durchgeführt. Alle Fehler der Fitparameter sind durch den asymptotischen Standardfehler angegeben. Um das globale Minimum des Fits zu finden, wurden die Startwerte für k_{on}^* und k_{off} bzw. k_{2on}^* und k_{2off} von $10^{-6} \frac{1}{s}$ bis $10^6 \frac{1}{s}$ in 10er Potenzschritten permutiert. Bei langen FRAP Messungen wurden die Zeitintervalle der Aufnahme zu späteren Zeiten erhöht. In diesen Fällen wurden die Datenpunkte dementsprechend gewichtet.

2.4.2 Bildbearbeitung

Die Bildbearbeitung erfolgte im Allgemeinen mit ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) Version 1.44b.

Immunzytochemisch gefärbte Zellen

Aus den z-Stapeln durch die Zellen wurden Maximumprojektionen erstellt.

Zeitreihen der Online- und FRAP-Messungen

Für Zeitserien über einen langen Zeitraum, insbesondere bei Messungen der MDC1 und 53BP1 Proteine, bewegten sich die Zellen oft während der Aufnahme. In diesen Fällen wurde die Bewegung der Zellen mittels Bildbearbeitung kompensiert. Hierfür wurden der StackReg Plugin (Philippe Thevenaz, Lausanne, Schweiz) ([Thévenaz et al., 1998](#)) der ImageJ software Version 1.44b und der "Object stabilizer" der Software Huygens Essential (Hilversum, Niederlande) verwendet.

FRET Aufnahmen

Die dargestellten Fluoreszenzaufnahmen, aber nicht die Polarisationsanisotropieaufnahmen, wurden teilweise mit dem ImageJ Plugin "PureDenoise" Version 12/06/2010 (Florian Luisier, Lausanne, Schweiz) bearbeitet ([Luisier et al., 2010](#)). Alle Polarisationsanisotropieaufnahmen wurden nach Formel [3.28](#) aus den Bildern beider Kameras berechnet. Für eine rauschärmere Darstellung wurden die Bilder mit dem Gaussian Blur Filter bearbeitet.

Ergebnisse

3.1 Akkumulation von DNA Reparaturproteinen in strahlungsinduzierten Foci

Eine Vielzahl von Proteinen, die an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind, akkumulieren in der Nähe des Schadens zu sogenannten strahlungsinduzierten Foci (engl. IRIF "ionizing radiation induced foci"). Der zeitliche Verlauf dieser Foci-Entstehung kann für verschiedene Proteine stark variieren. Solche, die in den ersten Schritten der DSB-Detektion benötigt werden, akkumulieren schneller als Proteine, die für spätere Prozessierungsschritte verantwortlich sind. In dieser Arbeit wurden die Reparaturproteine ATM, ATR, MDC1, NBS1 und 53BP1 mit dem, an der GSI einzigartigen, sogenannten Strahlplatz-Mikroskop untersucht. Der genaue Aufbau ist in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Mit dem Strahlplatz-Mikroskop ist es möglich, mikroskopische Bilder von lebenden Zellen simultan zur Ionenbestrahlung aufzunehmen. Eine beispielhafte Messung ist in Abbildung 3.1 gezeigt. U2OS Zellen, die 53BP1-GFP stabil exprimierten, wurden mit Au-Ionen zum Zeitpunkt $t=0$ bestrahlt und gleichzeitig mikroskopisch aufgenommen. Eine Akkumulation des 53BP1-GFP an den strahlungsinduzierten DNA-Schäden ist deutlich zu erkennen. Die Intensität der Foci nimmt über die Zeit zu. Auf diese Weise lässt sich mit dem Online-Mikroskop die Entstehung von Foci messen. Hieraus resultieren die in den folgenden Abbildungen dargestellten Rekrutierungskurven, die die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzintensität der Foci beschreiben.

3.1.1 Kinetik der Foci-Bildung verschiedener Proteine nach Ionenbestrahlung

Die Reparaturproteine akkumulierten mit teils sehr unterschiedlichem zeitlichem Verlauf in strahlungsinduzierten Foci. Abbildung 3.2 stellt dies für die Proteine ATM, ATR, MDC1, NBS1 und 53BP1 dar. NBS1, MDC1 und ATM1 rekrutierten vergleichsweise schnell innerhalb von wenigen Minuten. ATR akkumulierte deutlich langsamer mit einer Sättigung bei ca. 20 min. Die Intensität der 53BP1 Foci stieg zu diesem Zeitpunkt immer noch weiter an. Die langsamen Rekrutierungskinetiken von ATR und 53BP1 zeigten außerdem eine deutliche Verzögerungsphase und einen sigmoiden Kurvenverlauf. Die in Abbildung 3.2 gezeigten Rekrutierungskurven der verschiedenen Proteine entstammen unterschiedlichen Arten der Bestrahlung. Inwiefern die Art der Bestrahlung die Rekrutierungskinetiken beeinflusst, wird im Folgenden beschrieben.

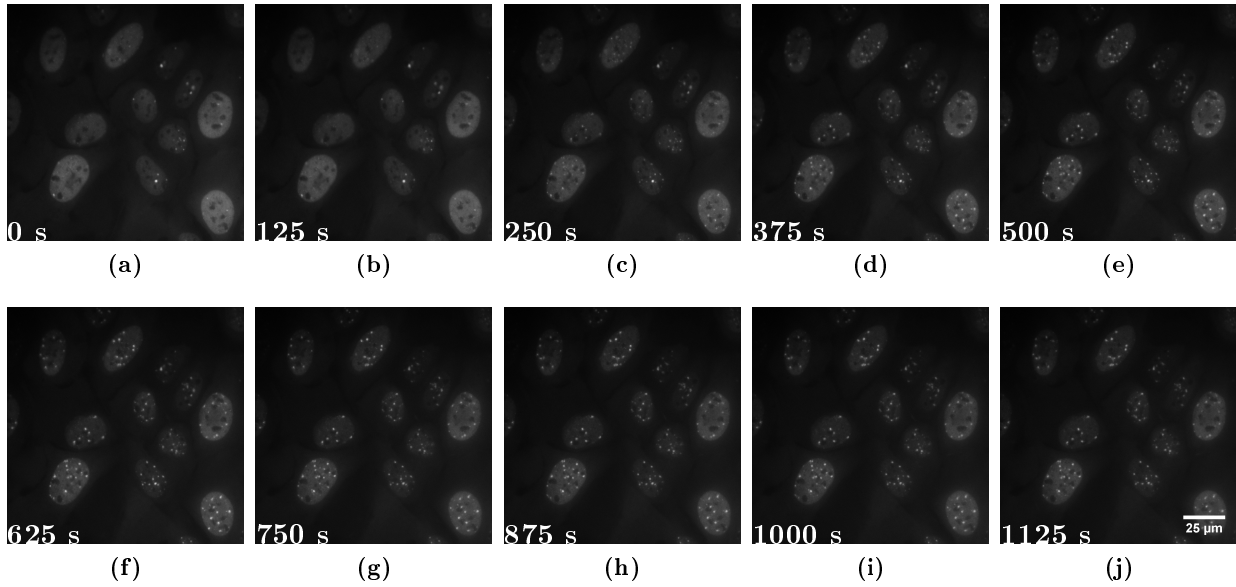


Abbildung 3.1: Messungen mit dem Strahlplatz-Mikroskop von 53BP1-GFP bei Bestrahlung mit Au-Ionen. Stabil transfizierte U2OS Zellen wurden zum Zeitpunkt $t=0$ s mit Au Ionen bestrahlt. Gleichzeitig zur Bestrahlung wurde eine zeitliche Bildfolge aufgenommen. Jedes 25. Bild der Serie ist hier gezeigt. 53BP1 akkumuliert an den strahlungsinduzierten DNA-Schäden zu Foci.

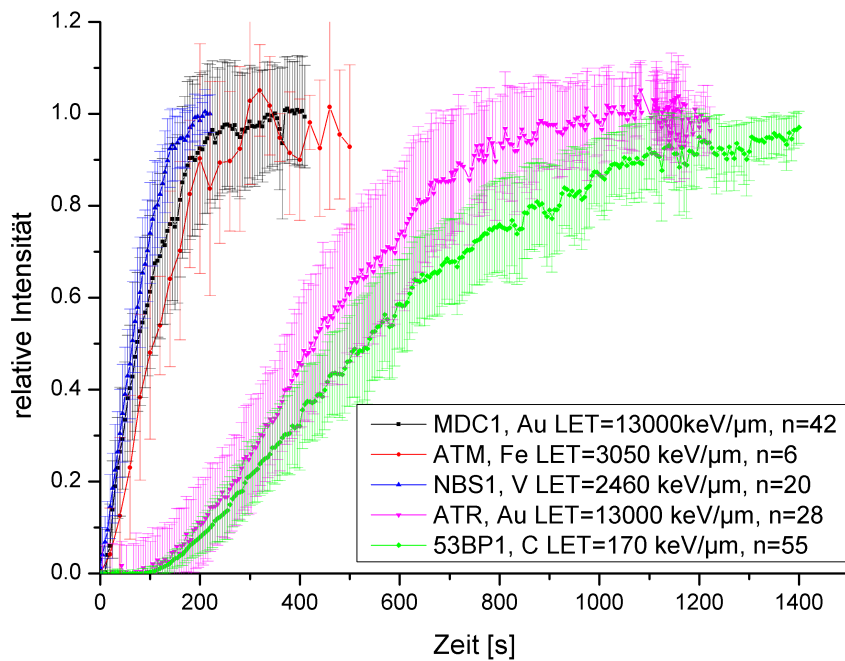


Abbildung 3.2: Rekrutierung von Reparaturproteinen nach Ionenbestrahlung. Wie in Abbildung 3.1 beispielhaft dargestellt, akkumulieren Reparaturproteine nach DNA-Schadensinduktion in Foci. Diese Kurven zeigen den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensitätszunahme in den Foci für verschiedene Proteine. MDC1-GFP, NBS1-GFP, ATR-GFP und 53BP1-GFP in U2OS Zellen, ATM-YFP in Hela Zellen. Die Intensität vor der Bestrahlung ist auf 0 und das Plateau nach langen Zeiten auf 1 normiert. Fehlerbalken: Standardabweichung.

3.1.2 Abhängigkeit der Rekrutierungskinetik von der Schadensdichte

Mit zunehmender Ladung der Ionen steigt der LET, bei gleicher spezifischer Ionenenergie, und damit die erzeugte Schadensdichte. Im Folgenden wird das Rekrutierungsverhalten von vier ausgewählten Reparaturproteinen NBS1, MDC1, 53BP1 und ATR in Abhängigkeit der Schadensdichte untersucht. Die Zeitkonstanten beschreiben in all diesen Fällen den Zeitpunkt, an dem das Signal 63 % des Plateauwerts erreicht hat.

NBS1

Das Rekrutierungsverhalten des Proteins NBS1 zeigte eine starke Abhängigkeit von der Schadensdichte. Die Rekrutierung von NBS1 ist bei Bestrahlung mit schweren Ionen mit einem sehr hohen LET deutlich schneller als bei leichteren Ionen (siehe Abb. 3.3a). Die Zeitkonstante dieser Rekrutierungskurven (63 %-Wert) ist in Abbildung 3.3b über dem LET dargestellt. Bis zu einem LET von fast 3000 keV/ μm nimmt die Zeitkonstante von ca. 240 s auf ca. 95 s deutlich ab. Die Rekrutierung wird also schneller. Eine weitere Erhöhung des LET führt zu keiner weiteren Beschleunigung der Rekrutierung.

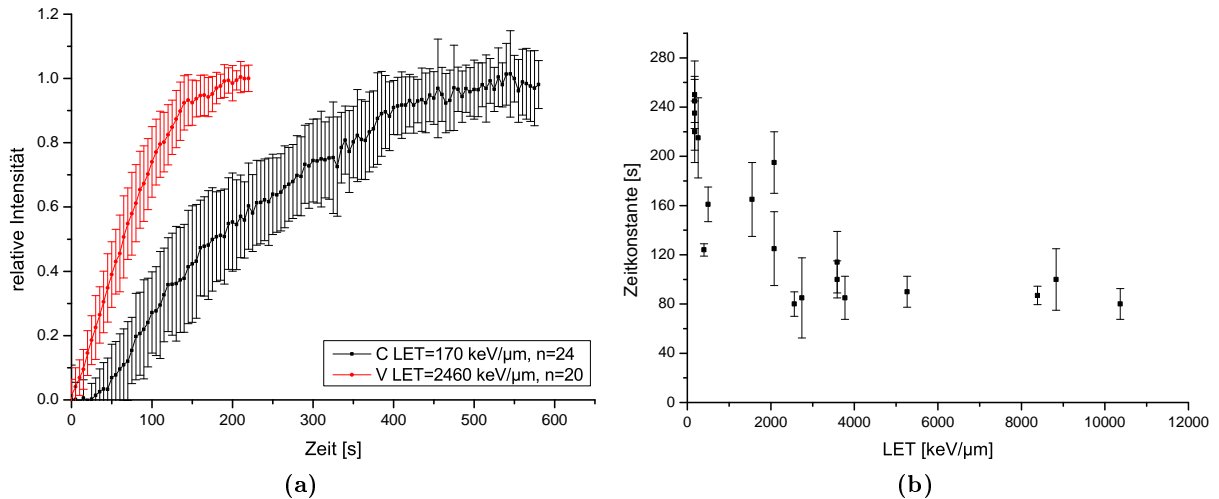


Abbildung 3.3: Abhängigkeit der NBS1 Rekrutierung von der Schadensdichte. (a): Beispielhafte Rekrutierungskinetiken von NBS1 nach Bestrahlung mit C- und V-Ionen. Fehlerbalken: Standardabweichung. (b): Aus den NBS1-Rekrutierungskurven bestimmte Zeitkonstanten (63 %-Werte) für verschiedene LET. Fehlerbalken: 95 %-Konfidenzintervall. (Messungen von Dr. B. Jakob)

Um diese Abhängigkeit der NBS1 Rekrutierung von der Schadensdichte näher zu untersuchen, wurden die Zellen mit Hilfe des Microbeamaufbaus der GSI mit einer definierten Anzahl von Ionen bestrahlt. Der genaue Aufbau ist in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Mit der Treffergenauigkeit dieses Aufbaus von unter 1,0 μm wurden 1, 10 oder 30 Stickstoffionen auf einen Punkt im Zellkern geschossen. Die Treffer verteilen sich statistisch auf eine Fläche von 500 nm x 700 nm. Der LET eines Stickstoffions beträgt 400 keV/ μm . Es stellte sich die Frage, ob diese Art der Bestrahlung mit mehreren relativ leichten Ionen, die Schadensdichteverteilung der Hoch-LET Bestrahlung mit einem sehr schweren Ion simulieren kann. Die Rekrutierungskinetiken sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Die Ionenanzahl hat keinen Einfluss auf die Rekrutierungsgeschwindigkeit. In allen drei Fällen ist die Rekrutierung gleich schnell. Die Zeitkonstante beträgt 124 ± 5 s.

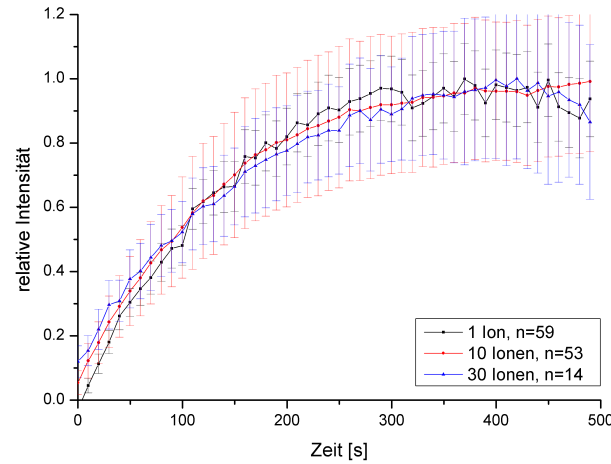


Abbildung 3.4: Rekrutierung von NBS1 nach Microbeam-Bestrahlung mit 1, 10 oder 30 Stickstoffionen in einem Punkt. Fehlerbalken: Standardabweichung.

MDC1

Bei der Untersuchung der LET-abhängigen Rekrutierungsgeschwindigkeit des Proteins MDC1 konnte, wie bei NBS1, eine schnellere Rekrutierung bei Bestrahlung mit sehr schweren Ionen festgestellt werden (siehe Abb. 3.5a). Auffällig ist jedoch, dass sich nicht nur die Geschwindigkeit, sondern auch der Verlauf der Kinetik verändert. Sie verwandelte sich von einem eher linearen Verlauf bei C- und Ar-Ionenbestrahlung zu einem mehr gekrümmten Verlauf bei Au- und U-Ionenbestrahlung. Die Abhängigkeit der Zeitkonstante vom LET ist in Abbildung 3.5b gezeigt. Die Zeitkonstante verringert sich mit steigendem LET startend von ca. 260 s und erreicht im LET-Bereich von 3700 keV/ μ m bis 8800 keV/ μ m ein unteres Limit von ca. 105 s. Mit weiter steigendem LET ist keine weitere Abnahme der Zeitkonstante zu beobachten.

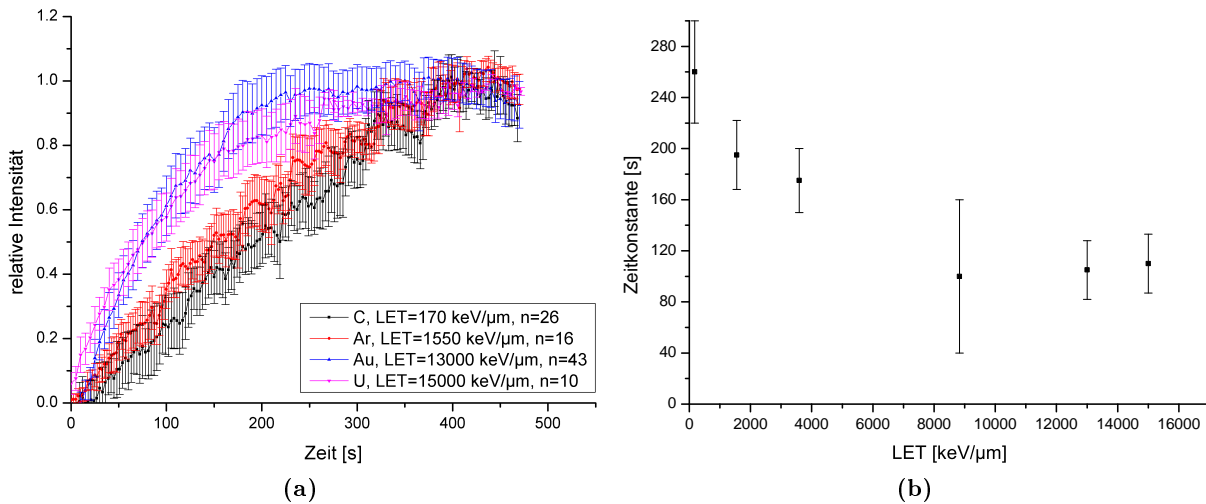


Abbildung 3.5: Rekrutierung von MDC1 nach Ionenbestrahlung mit verschiedenem LET. (a): Rekrutierungskurven von MDC1 nach Ar-, C-, Au- und U-Ionenbestrahlung. Fehlerbalken: Standardabweichung. (b): Zeitkonstanten der MDC1 Rekrutierungskurven für verschiedene LET. Fehlerbalken: 95 %-Konfidenzintervall.

53BP1

Die 53BP1 Proteinrekrutierung wurde nach C- und Au-Ionenbestrahlung gemessen (siehe Abb. 3.6). Der LET betrug $170 \text{ keV}/\mu\text{m}$ bzw. $13000 \text{ keV}/\mu\text{m}$. Die Rekrutierungskinetiken von 53BP1 waren für beide LET nahezu identisch. Gemäß diesen beiden Messungen hängt die 53BP1-Rekrutierungsgeschwindigkeit nicht von der Schadensdichte ab.

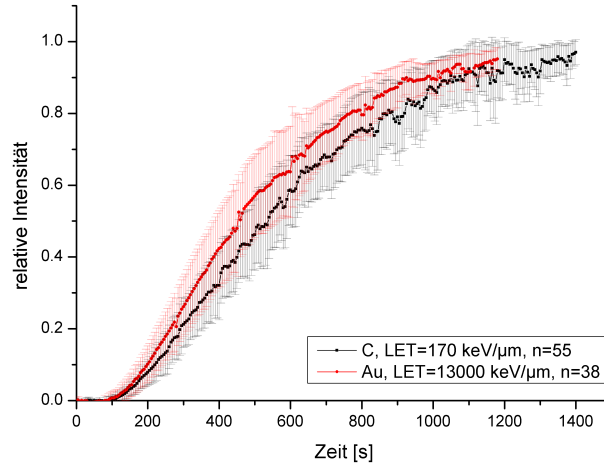


Abbildung 3.6: Rekrutierung von 53BP1 nach C- und Au- Ionenbestrahlung. Fehlerbalken: Standardabweichung.

ATR

Das DNA-Reparaturprotein ATR zeigte eine von der Schadensdichte abhängige Rekrutierung. Die Kinetik der ATR-Focibildung nach Au-Ionen mit einem LET von $13000 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$ ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Bei Bestrahlung mit leichteren Ionen, die eine geringere Schadensdichte erzeugen, zeigte sich, dass deutlich weniger Zellen ATR-Foci aufwiesen. Dies ist in Abbildung 3.7 gezeigt. Während nach Au-Ionenbestrahlung nahezu alle Zellen ein strahlungsinduziertes streifenförmiges DNA-Schadensmuster für ATR zeigten (siehe Abb. 3.7a), war das nach C-Ionenbestrahlung in deutlich weniger Zellen der Fall (siehe Abb. 3.7d). Die γH2AX Immunfluoreszenzfärbung zeigte jedoch auch nach C-Ionenbestrahlung ein eindeutig strahlungsinduziertes Schadensmuster in nahezu allen Zellen (siehe Abb. 3.7e). Da nach C-Ionenbestrahlung nur wenige Zellen ATR-Foci bildeten, wurde hierzu keine Rekrutierungskinetik erstellt.

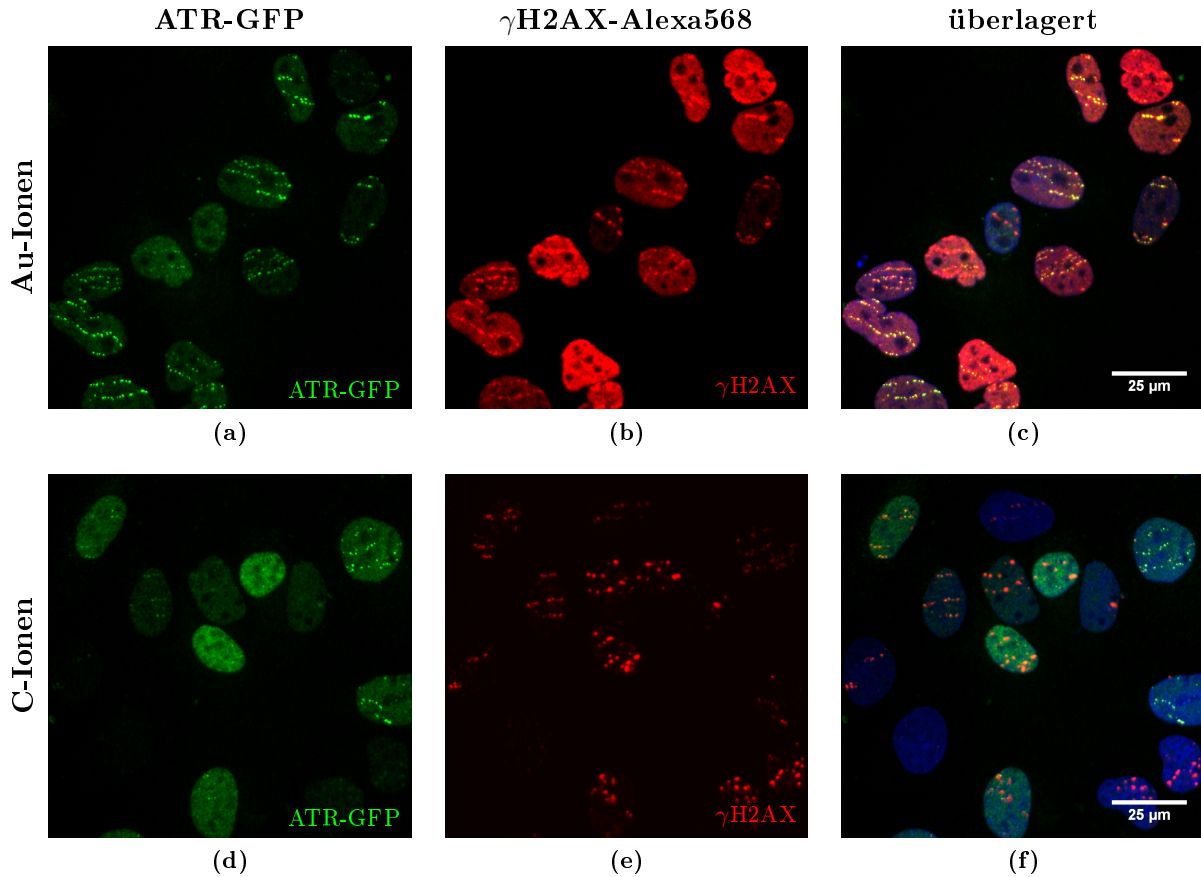


Abbildung 3.7: ATR-Rekrutierung nach C- und Au-Ionenbestrahlung. Stabil transizierte U2OS-Zellen mit ATR-GFP wurden 1 h nach Bestrahlung mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit Alexa568 immunzytochemisch gegen γ H2AX gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI gegengefärbt. (a)-(c): Au-Ionenbestrahlung (LET=13000 keV/ μ m). (d)-(f): C-Ionenbestrahlung (LET=170 keV/ μ m).

3.2 Analyse der Reparaturproteindynamik in lebenden Zellen

Um die Bindungscharakteristiken der Proteine an DNA-Schadstellen und den Einfluss unterschiedlicher Schadensdichten zu untersuchen, wurde ein FRAP-Messplatz aufgebaut. Mit diesem ist es möglich, das zu untersuchende Protein, das mit einer fluoreszierenden Markierung versehen ist, in einem kleinen definierten Bereich innerhalb einer lebenden Zelle irreversibel zu bleichen. Dies erlaubt eine Subpopulation aller markierten Proteine zu untersuchen und somit auf deren dynamisches Verhalten zu schließen. Der gebleichte Bereich füllt sich nach einiger Zeit wieder mit nicht gebleichten Proteinen aus der Umgebung. Der zeitliche Verlauf dieses Prozesses spiegelt die Mobilität der Proteine wider.

3.2.1 Einführung und Charakterisierung des FRAP Aufbaus

Der FRAP Aufbau basiert auf einem Leica (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) DM LA Stativ mit einer Leica CTR MIC Steuereinheit. Über die Lasereinkopplung Leica AS LMD ist ein 337 nm Stickstoffgaslaser integriert. Das System wird über die Software Leica Laser Microdissection System LMD Version 4.4.0.0 und die Laserkontrollereinheit-Firmwareversion 1.15

gesteuert. Um dieses Mikroskop für FRAP Messungen zu erweitern, wurde eine zweite AS LMD Lasereinkopplung eingebaut, an die ein 100 mW Diodenlaser mit der Wellenlänge 473 nm montiert wurde. Es handelt sich um das Lasermode DPL 473-OEM (Rapp OptoElectronics, Hamburg, Deutschland). Der Aufbau ist in Abbildung 3.8 in einem Foto und schematisch gezeigt. Der Diodenlaser wurde über einen Strahlteiler Q480 LP (Chroma Technology Corporation, Bellows Falls, USA) in den Strahlengang eingekoppelt. Wahlweise kann die Einkopplung für den UV- oder für den 473 nm-Laser mit der Software gesteuert werden. Dies ermöglicht auch für den 473 nm-Laser völlig frei wählbare Positionen des Laserfokus auf der Probe. Die Fluoreszenzanregung erfolgte über den Monochromator Polychrome V (TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland). Dieser wird über einen Lichtleiter und durch den GFP-Filterwürfel (Leica, 513847) in den Strahlengang eingekoppelt. Für die im Anschluss gezeigten Messungen wurde ein 100x Objektiv verwendet (Leica HCX PL Fluotar 100x/1,3 Öl Nr. 506199). Da sich in ersten Tests zeigte, dass eine schnelle und damit sensitive Kamera essentiell für derartige FRAP Messungen ist, wurde die EM-CCD Kamera des Typs DU-888E-C00-#BV oder DV887ECS-BV von Andor Technology (Belfast, Irland) verwendet. Die Bildaufnahme erfolgte über die AndorIQ software Version 1.10.3 im "Fast LZ" Modus. Dies ermöglicht zum einen eine schnelle Aufnahme von Bildern und zum anderen das synchrone Schalten der Lichtquelle, was den unerwünschten Fluoreszenzsignalverlust während der Aufnahme minimiert.

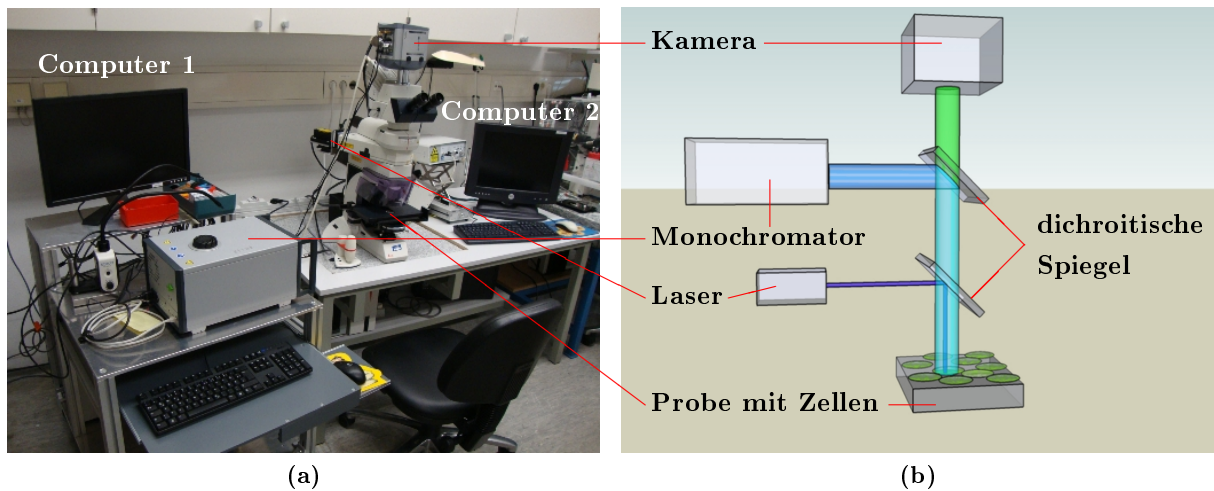


Abbildung 3.8: Aufbau des FRAP Messplatzes. (a): Foto des Aufbaus (b): Schematische Darstellung des Aufbaus. Der zusätzliche UV-Laser ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Der obere dichroitische Spiegel ist Teil des GFP Filterwürfels. Während die Bildaufnahme über Computer 1 erfolgt, steuert Computer 2 den 473 nm Laser.

Dieser Aufbau ermöglicht sehr schnelle Bildsequenzaufnahmen mit Frequenzen schneller als 10 Hz. Wird die Auslesefläche des Kamerachips verkleinert, so sind Messungen mit einer Frequenz von 60 Hz möglich (Binning: 4x4, Chipauslesefläche: 75x79 pixel). Das FWHM (Full Width at Half Maximum) des Laserfokus wurde in fixierten Zellen auf $3,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$ bestimmt. Die Geometrie des resultierenden gebleichten Bereichs zeigt Abbildung 3.9. Sie ähnelt einer Zylinderform.

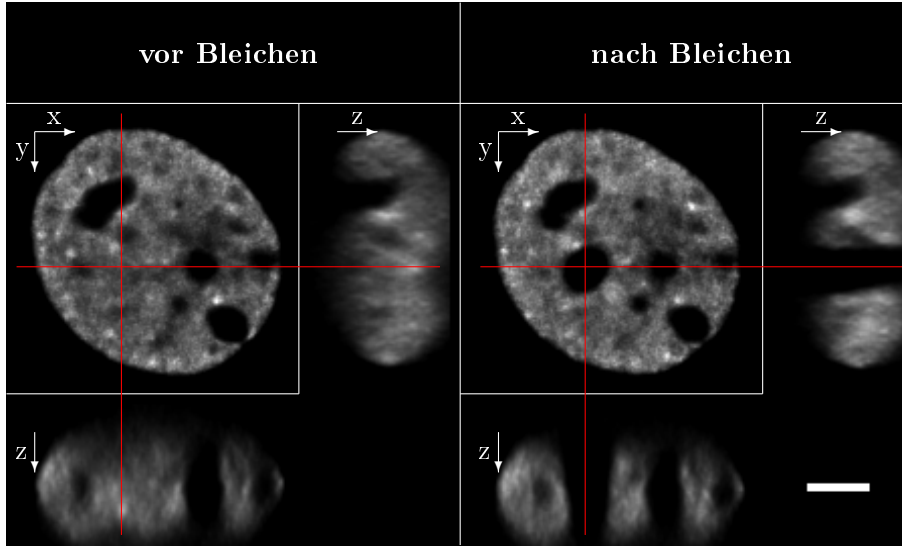


Abbildung 3.9: Geometrie des gebleichten Bereichs. U2OS Zellen, stabil transfiziert mit MDC1-GFP, wurden mit Paraformaldehyd fixiert. Zur dreidimensionalen Datenerfassung wurde ein Bildstapel der verschiedenen Fokusebenen aufgenommen, der anschließend der Dekonvolution unterzogen wurde. Links: vor dem Bleichen; rechts: nach dem Bleichen. Das Profil in z-Richtung entlang den roten Linien ist rechts und unter dem jeweiligen Bild gezeigt. Maßstab: 5 μm

Eine typische Bildserie einer FRAP Messung zeigt Abbildung 3.10. Zunächst werden einige Bilder vor dem Bleichen aufgenommen, da diese für die spätere Normierung benötigt werden. Zum Zeitpunkt 0 s wird ein Bereich im Zellkern gebleicht (siehe Pfeile in Abbildung 3.10c). Die Zunahme des Fluoreszenzsignals wird über die Zeit gemessen. Die Geschwindigkeit der Intensitätszunahme im gebleichten Bereich spiegelt den Austausch mit umliegenden nicht gebleichten Proteinen wider.

Abbildung 3.10o zeigt beispielhaft die für die Auswertung nötigen gemessenen Bereiche des Bleichpunkts (grün), des Zellkerns (cyan) und des Hintergrunds (rot). Aus den mittleren Signalen werden, zur Erstellung der FRAP-Kurven, Normierungen auf die Signalintensität vor dem Bleichen und den Signalverlust während der Aufnahme nach folgender Formel durchgeführt (Phair et al., 2004a).

$$I_{\text{doppelnormiert}}(t) = \frac{I(t) - BG(t)}{I_{\text{vorBleichen}} - BG(t)} \cdot \frac{T_{\text{vorBleichen}} - BG(t)}{T(t) - BG(t)} \quad (3.1)$$

Die mit dem Index "vorBleichen" gekennzeichneten Variablen bezeichnen den Durchschnittswert aus allen Bildern vor dem Bleichpuls. BG steht für das Fluoreszenzsignal im Hintergrund, I für das im gebleichten Bereich und T für das des gesamten Zellkerns. Nach diesen Normierungen ergeben sich FRAP Kurven wie im restlichen Kapitel dargestellt. Der Wert 0 entspricht dabei dem Wert des Hintergrunds, und 1 dem durchschnittlichen Wert im gebleichten Punkt aller Bilder vor dem Bleichpuls.

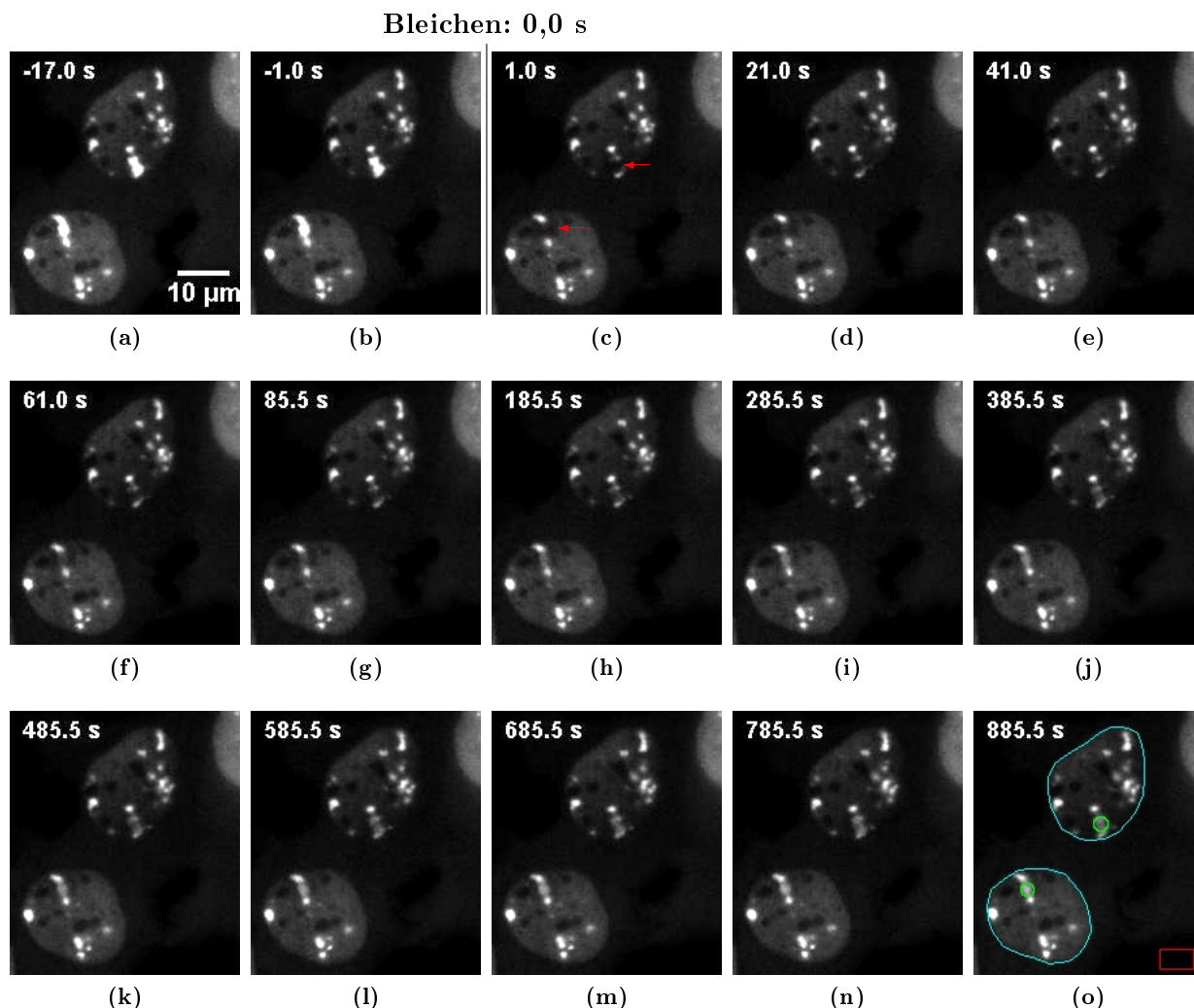


Abbildung 3.10: Bilder aus einer FRAP-Zeitserie. U2OS Zellen, stabil transfiziert mit 53BP1-GFP, wurden mit C-Ionen bestrahlt. Kleine Bereiche im streifenförmigen DNA-Schadensmuster wurden zum Zeitpunkt 0 s in beiden Zellen gebleicht (siehe markierte Stelle in (c)). Das Fluoreszenzsignal der Zellen wurde über die Zeit gemessen. Diese Abbildung zeigt ca. jedes 20. Bild der Zeitserie. Abbildung (o) zeigt die für die Auswertung nötigen gewählten Bereiche. Grüner Kreis: gebleichter Bereich, cyan umrandet: ganzer Zellkern und rotes Rechteck: Hintergrund.

3.2.2 Freie Diffusion im Nukleoplasma

Um die Mobilität, der im Folgenden beschriebenen Proteine besser einordnen zu können, wurden zunächst Experimente mit reinem GFP durchgeführt, das nicht an ein funktionelles Protein gekoppelt war. Ein beliebiger Bereich im Zellkern wurde gebleicht. Da reines GFP keine biologische Funktion besitzt, ermöglicht dieses Experiment die Untersuchung der viskosen Bedingungen im Kern humaner Zellen. In Abbildung 3.11 ist die resultierende FRAP Kurve gezeigt. Das GFP erreicht innerhalb weniger Sekunden wieder den Anfangswert von 1. Bereits nach 0,3 s sind 90 % der Ursprungsintensität erreicht.

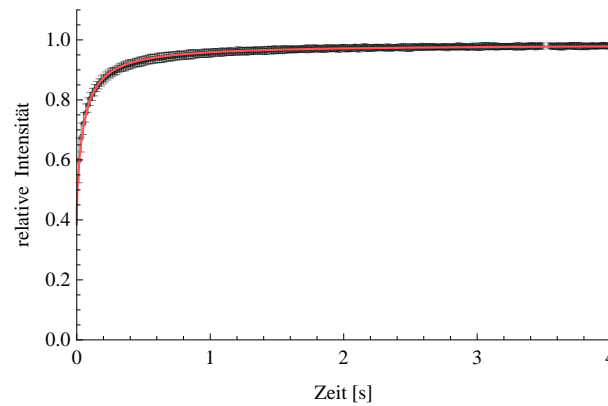


Abbildung 3.11: FRAP Messungen von freiem GFP im Nukleoplasma humaner U2OS Zellen (n=45). Rote Linie: Fit mit dem Diffusionsmodell (siehe Abschnitt 3.2.5). Das Fitergebnis ist in Abschnitt 3.2.6 beschrieben. Fehlerbalken: Standardabweichung.

3.2.3 Reparaturproteindynamik in lebenden humanen Zellen

Somit konnte die Dynamik von NBS1, ATR, 53BP1 und MDC1 im Zellkern von lebenden humanen Zellen, zunächst ohne DNA-Schaden, untersucht werden. Hierzu wurde wieder ein beliebiger Bereich im Zellkern gebleicht und der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten an diesen Stellen gemessen. NBS1 und insbesondere ATR zeigten sehr schnelle Zunahmen auf den ursprünglichen Wert 1, während die Zunahme von MDC1 und 53BP1 deutlich verlangsamt waren (siehe Abbildung 3.12). Erst nach einer sehr langen Zeit von über 900 s nach dem Bleichen ging die Fluoreszenzintensität von 53BP1 auf den ursprünglichen Wert zurück (siehe Abbildung 3.31a).

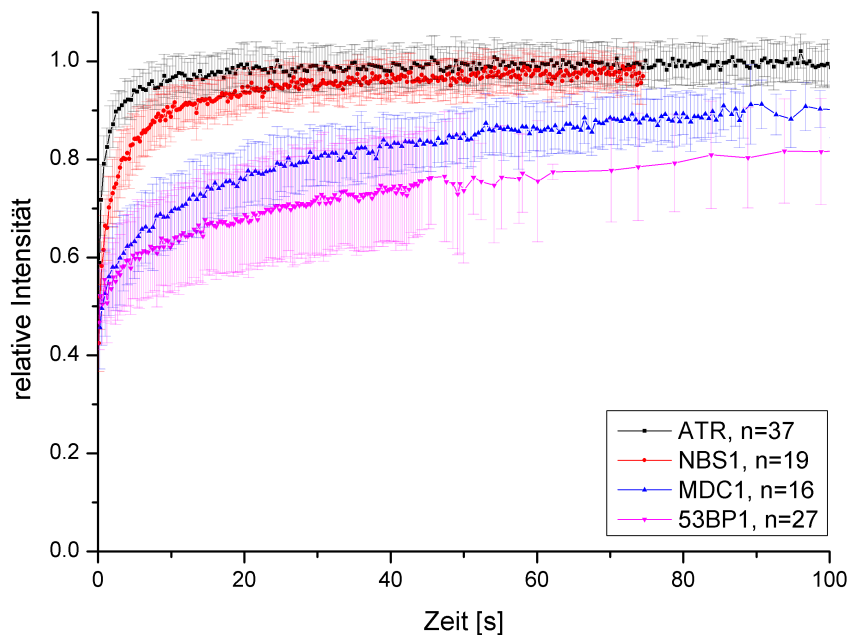


Abbildung 3.12: Reparaturproteindynamik im Zellkern lebender humaner Zellen. FRAP Kurven von beliebigen Bereichen im Zellkern humaner U2OS-Zellen, die stabil mit MDC1, NBS1, ATR oder 53BP1 transfiziert wurden. Fehlerbalken: Standardabweichung.

3.2.4 Dynamisches Austauschverhalten der Reparaturproteine am DNA-Schaden nach Röntgenbestrahlung

Nachdem die Viskositätseigenschaften des Nukleoplasmas und die Mobilität der Reparaturproteine im Zellkern untersucht wurden, konnte schließlich die Analyse des Bindungsverhaltens in strahlungsinduzierten Foci untersucht werden. Zunächst wurden durch Röntgenbestrahlung (250 kV) mit einer Dosis von 2 Gy, DNA-Schäden in den Zellen induziert. Nachdem sich ein Gleichgewicht in der Proteinakkumulation eingestellt hatte und die Fociintensität nicht weiter zunahm, wurden einzelne Foci gebleicht. Die Geschwindigkeit des Loslösens gebleichter und des Bindens ungebleichter Proteine spiegelt direkt das Bindungsverhalten der Reparaturproteine an den DNA-Schadstellen wider. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Analog zum dynamischen Verhalten der Proteine in unbestrahlten Zellen, zeigte NBS1 das schnellste Austauschverhalten. 53BP1 wurde sehr langsam ausgetauscht und MDC1 lag dazwischen (vergleiche Abschnitt 3.2.3). Wie bereits in Abschnitt 3.1.2 gezeigt, hängt die ATR-Focibildung stark von der induzierten DNA-Schadensdichte ab (siehe auch Abbildung 3.7). Demzufolge zeigte sich, dass durch Röntgenbestrahlung keine ATR-Foci induziert werden konnten und die entsprechende Messung hier nicht möglich war.

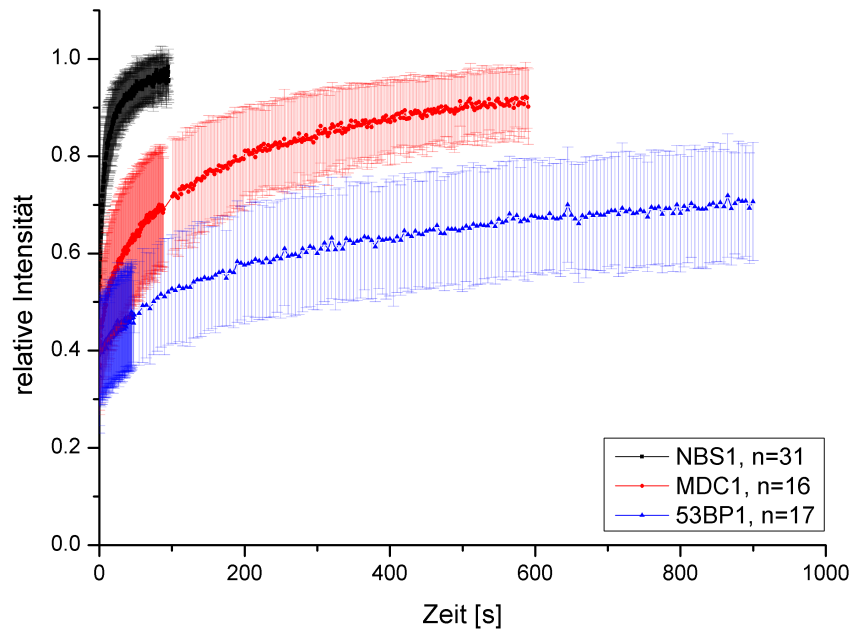


Abbildung 3.13: FRAP Messungen in strahlungsinduzierten Foci in U2OS Zellen nach Röntgenbestrahlung. Fehlerbalken: Standardabweichung.

3.2.5 Modellierung der FRAP Kurven

Die Beschreibung der FRAP-Kurven erfolgte bis hierhin nur qualitativ. Fast alle Aussagen beschränkten sich auf Vergleiche wie "schneller" und "langsamer". Um die Ergebnisse besser quantitativ beschreiben zu können, müssen diese modelliert werden. Dann können Aussagen zu den tatsächlichen Diffusionsgeschwindigkeiten der Proteine und deren Bindungskonstanten getroffen werden. Die Ansätze der verschiedenen gewählten Modelle werden in diesem Kapitel beschrieben.

Zahlreiche Modelle zur Beschreibung von FRAP Kurven sind publiziert. Einige davon sind in

(Carrero et al., 2003) zusammengefasst. Im Wesentlichen lassen sich die Modelle in drei verschiedene Klassen einteilen:

- **Diffusionsbasierte Modelle:** Der Verlauf der FRAP Kurven wird lediglich durch die Diffusion der GFP-markierten Proteine bestimmt. Dies ist auch dann der Fall, wenn die Proteine zusätzlich zur Diffusion noch Bindungsverhalten zeigen, diese Art der Bindung aber sehr schnell im Vergleich zur Diffusion ist. Dadurch stellt sich sehr lokal ein Gleichgewicht der gebundenen Proteine ein. Auch in diesem Fall können die FRAP Kurven mit dem Diffusionsmodell beschrieben werden, allerdings mit verlangsamter Geschwindigkeit. Dieser Fall wird als effektive Diffusion bezeichnet.
- **Reaktionsbasierte Modelle:** Der Verlauf der FRAP Kurve wird lediglich durch das Bindeverhalten der Proteine beschrieben. Die Diffusion spielt hierbei keine Rolle. Sie verläuft in diesen Fällen instantan sehr schnell ab und beeinflusst so den Verlauf der Kurve schon nach wenigen Messpunkten nicht mehr.
- **Diffusions-Reaktionsgekoppelte Modelle:** Die Reaktions- bzw. Bindungsprozesse und die Diffusion der Proteine sind direkt gekoppelt. Beide beeinflussen sich gegenseitig und bestimmen so den Kurvenverlauf.

Folgende Modelle wurden verwendet um die Daten in dieser Arbeit zu analysieren. In allen Fällen wird eine Bindung durch eine Reaktion erster Ordnung beschrieben:



F beschreibt die frei diffundierenden Proteine, S die freien Bindungsstellen und C die mit Proteinen besetzten Bindungsstellen. Befindet sich das System für den Zeitraum der FRAP-Messung im Gleichgewicht, so ändert sich die Anzahl der freien Bindungsstellen nicht mit der Zeit. Dieser Zustand wird auch durch das lokale Bleichen nicht gestört, da die Proteine dadurch nur "unsichtbar" werden, nicht aber ihre Funktion ändern. Aus diesem Grund kann eine Reaktion pseudo erster Ordnung angenommen werden, bei der die Konzentration der freien Bindungsstellen im Gleichgewicht (S_{eq}) durch eine veränderte Bindungskonstante $k_{on}^* = k_{on}S_{eq}$ beschrieben werden kann (Sprague et al., 2004, 2006). Die Reaktionsgleichung lautet dann:



In allen Modellen wird angenommen, dass das Fluoreszenzsignal für $t \rightarrow \infty$ wieder den Ausgangswert von 1 erreicht. Der Plateauwert I_∞ beträgt somit in allen Fällen 1. Außer wenn eine zusätzliche völlig immobile Fraktion existiert, ist er entsprechend kleiner. Eine Übersicht über die im Folgenden beschriebenen Modelle, ist zusätzlich in Tabelle 4.2 gezeigt.

- Zur Beschreibung der **Diffusion** und der **effektiven Diffusion** wurde ein Modell angewandt, das von Axelrod et al. (1976) entwickelt und von Soumpasis (1983) modifiziert wurde. Das Modell beschreibt eine zweidimensionale reine Diffusion nach Gleichung 3.4. Die Konzentration der fluoreszierenden Proteine ist beschrieben durch $F(\vec{r}, t)$, bezeichnet im Folgenden mit F .

$$\frac{\partial F}{\partial t} = D \nabla^2 F \quad (3.4)$$

FRAP-Kurven, nach dem Bleichen mit einem uniformen zirkulären Laserprofil, werden in diesem Fall mit folgender Formel beschrieben:

$$I(t) = I_\infty - \Phi + \Phi e^{-\frac{\omega^2}{2Dt}} \left[I_0 \left(\frac{\omega^2}{2Dt} \right) + I_1 \left(\frac{\omega^2}{2Dt} \right) \right] \quad (3.5)$$

Φ ist die Bleichtiefe, ω der Bleichpunktradius, D die Diffusionskonstante und t die Zeit nach dem Bleichpuls. I_0 und I_1 sind modifizierte Besselfunktionen erster Gattung. Φ gibt an, um welchen Anteil das Fluoreszenzsignal durch das Bleichen verringert wurde. Φ und ω können in separaten Experimenten mit fixierten Zellen oder mit Proteinen, die sehr fest gebunden sind, wie z.B. der Histoneinheit H2B, ermittelt werden. I_∞ ist im Fall der freien Diffusion 1. Somit bleibt für diesen Fall nur ein freier Fitparameter, nämlich D .

Im Falle der effektiven Diffusion muss D in Gleichung 3.5 durch D_{eff} ersetzt werden:

$$I(t) = I_\infty - \Phi + \Phi e^{-\frac{\omega^2}{2D_{eff}t}} \left[I_0 \left(\frac{\omega^2}{2D_{eff}t} \right) + I_1 \left(\frac{\omega^2}{2D_{eff}t} \right) \right] \quad (3.6)$$

Im Falle der effektiven Diffusion beinhaltet D_{eff} zum einen die theoretische freie Diffusion D des Proteins ohne jegliche Bindung, und zum anderen eine schnelle Bindung im Vergleich zur Diffusion nach Gleichung 3.3 mit folgendem Zusammenhang (Sprague et al., 2004):

$$D_{eff} = \frac{D}{1 + \frac{k_{on}^*}{k_{off}}} = \frac{D}{\gamma_{eff}} \quad (3.7)$$

Der frei diffundierende, ungebundene Anteil ist gegeben durch:

$$F_{eq} = \frac{1}{\gamma_{eff}} \quad (3.8)$$

- **Im Reaktionsbasierten Fall** kann der Beitrag der Diffusion für die FRAP Messungen vernachlässigt werden. Ein Bindungszustand nach Gleichung 3.3 kann mit folgender Formel beschrieben werden (Sprague et al., 2004; McNally, 2008):

$$I(t) = I_\infty - C_{eq} e^{-k_{off}t} \quad (3.9)$$

C_{eq} beschreibt den gebundenen Anteil und k_{on}^* ist in diesem Fall gegeben durch:

$$k_{on}^* = \frac{C_{eq} k_{off}}{\Phi - C_{eq}} \quad (3.10)$$

Werden zwei verschiedene Bindungszustände nach Gleichung 3.3 modelliert, so wird eine zweite Exponentialfunktion hinzugefügt. Die Funktion lautet dann:

$$I(t) = I_\infty - C_{1eq} e^{-k_{1off}t} - C_{2eq} e^{-k_{2off}t} \quad (3.11)$$

k_{1on}^* und k_{2on}^* sind in diesem Fall gegeben durch:

$$k_{1on}^* = \frac{k_{1off} C_{1eq}}{\Phi - (C_{1eq} + C_{2eq})} \quad k_{2on}^* = \frac{k_{2off} C_{2eq}}{\Phi - (C_{1eq} + C_{2eq})} \quad (3.12)$$

- Der komplexeste und damit auch aufwändigste Fall ist der **Diffusions-Reaktionsgekoppelte**. Hierbei muss das Diffusions- und Reaktionsverhalten und deren gegenseitige Beeinflussung modelliert werden. [Sprague et al. \(2004\)](#) publizierten ein Modell, in dem analog zum effektiven Diffusionsverhalten die Diffusion und eine Bindung nach Gleichung 3.3 die FRAP-Kurve bestimmen. Im Gegensatz zur effektiven Diffusion unterliegt die Bindung hierbei jedoch nicht der Einschränkung, dass sie schnell im Vergleich zur Diffusion sein muss. Dieses Modell wird im Weiteren als "Diffusionsmodell mit einer Bindung" bezeichnet. Die laplacetransformierte Lösung ist gegeben durch:

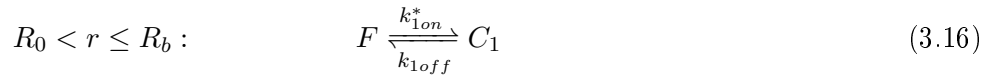
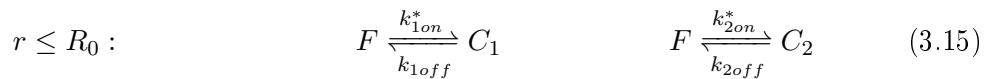
$$\bar{I}(p) = \frac{1}{p} - \frac{F_{eq}}{p} (1 - 2K_1(qw) I_1(qw)) \cdot \left(1 + \frac{k_{on}^*}{p + k_{off}}\right) - \frac{C_{eq}}{p + k_{off}} \quad (3.13)$$

mit w dem Bleichpunktradius, p der Laplacevariablen, K_1 und I_1 den modifizierten Besselfunktionen erster und zweiter Ordnung. Die Anteile an freiem bzw. gebundenem Protein im Gleichgewicht (F_{eq} bzw. C_{eq}) sind gegeben durch:

$$F_{eq} = \frac{k_{off}}{k_{on}^* + k_{off}} \quad C_{eq} = \frac{k_{on}^*}{k_{on}^* + k_{off}} \quad (3.14)$$

Für die in dieser Arbeit untersuchten Prozesse der DNA-Reparatur in strahleninduzierten Foci ist das Modell von [Sprague et al. \(2006\)](#) sehr geeignet. Sie beschreiben ein Modell zum Bindungsverhalten eines Transkriptionsfaktors an einen Promotor. Dieser Mechanismus ist sehr ähnlich zu der hier untersuchten Bindung von Proteinen an DNA-Schadstellen. Der Transkriptionsfaktor ist ebenfalls homogen im Zellkern verteilt und bindet zusätzlich an einen Promotor, was zu einer, mit Foci vergleichbaren, hellen Struktur im Kern führt. Durch das Bleichen dieser Struktur und die Modellierung der FRAP-Kurven kann das Bindeverhalten des Transkriptionsfaktors an den Promotor untersucht werden. Das von [Sprague et al. \(2006\)](#) beschriebene zweidimensionale radiale Bindungsmodell wurde auf die hier vorgestellten Daten zur Proteinbindung in strahleninduzierten Foci angewandt. Dieses Modell wird im Weiteren als "Diffusions-Reaktionsmodell" bezeichnet. Die Grundlagen und Annahmen des Modells werden im Folgenden vorgestellt.

Der Zellkern wird als eine zylinderförmige Struktur mit dem Radius R_b angenommen. Ein Fluss über die Zellkernmembran ist nicht möglich. Für die fokale Struktur und den Bleichpunkt des Lasers werden gleiche Ausdehnungen mit Radius R_0 angenommen. Das Modell beschreibt folgende Bindungen:



Befindet sich das frei diffundierende Protein F innerhalb des Fokus mit dem Radius R_0 , so kann es, nach Reaktionen pseudo erster Ordnung, an die Bindungsstellen S_1 und S_2 binden. Ist es außerhalb, so kann es nur an S_1 binden. k_{1on}^* bzw. k_{2on}^* sind gegeben durch:

$$k_{1on}^* = k_{1on}S_{1eq} \quad k_{2on}^* = k_{2on}S_{2eq} \quad (3.17)$$

mit S_{1eq} und S_{2eq} als Gleichgewichtskonzentrationen der freien Bindungsstellen S_1 und S_2 . Für die Bindung an S_1 wird vorausgesetzt, dass diese schnell im Vergleich zur freien Diffusion ist, und diese Bindung deshalb mit dem effektiven Diffusionsverhalten beschrieben werden kann. Daraus ergibt sich: $\gamma_{1eff} = 1 + \frac{k_{1on}^*}{k_{1off}}$. Die frei diffundierende Fraktion F und die an S_1 gebundene Fraktion C_1 lässt sich folglich als eine Einheit beschreiben mit $F_{1eff} = F + C_1$, die verlangsamtes Diffusionsverhalten zeigt. Mit den Variablentransformationen $u = F_{eq,1eff} - F_{1eff}$ und $v = C_{2eq} - C_2$ ergeben sich folgende zu lösende Differentialgleichungen:

$$r \leq R_0 : \quad \frac{\partial u}{\partial t} = D_{1eff} \nabla_r^2 u - \frac{k_{2on}^*}{\gamma_{1eff}} u + k_{2off} v \quad (3.18)$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} = \frac{k_{2on}^*}{\gamma_{1eff}} u - k_{2off} v \quad (3.19)$$

$$R_0 < r \leq R_b : \quad \frac{\partial u}{\partial t} = D_{1eff} \nabla_r^2 u \quad (3.20)$$

Die Anfangsbedingungen sind: $u(r, t = 0) = F_{eq,1eff}$, $v(r, t = 0) = C_{2eq}$ und $u(r, t = 0) = 0$. Mit Hilfe einer Laplacetransformation können diese Gleichungen analytisch gelöst werden. Die laplacetransformierte Lösung für die Fluoreszenzintensität im gebleichten Fokus ist:

$$\bar{I}(p) = \left(\frac{2AF_{eq,1eff}}{pq_1 R_0} I_1(q_1 R_0) \right) \cdot \left(1 + \frac{\frac{k_{2on}^*}{\gamma_{1eff}}}{p + k_{2off}} \right) \quad ; \text{ mit:} \quad (3.21)$$

$$q_1^2 = \frac{p}{D_{1eff}} \left(1 + \frac{\frac{k_{2on}^*}{\gamma_{1eff}}}{p + k_{2off}} \right) \quad (3.22)$$

$$q_2^2 = \frac{p}{D_{1eff}} \quad (3.23)$$

$$A = \left[I_0(q_1 R_0) - \frac{I_1(q_2 R_b) K_0(q_2 R_0) + I_0(q_2 R_0) K_1(q_2 R_b)}{I_1(q_2 R_0) K_1(q_2 R_b) - I_1(q_2 R_b) K_1(q_2 R_0)} \frac{q_1}{q_2} I_1(q_1 R_0) \right]^{-1} \quad (3.24)$$

I und K sind modifizierte Besselfunktionen erster und zweiter Gattung und p die Laplacevariable. $F_{eq,1eff}$, der Anteil der Fluoreszenz der anscheinend freien Spezies, also derjenigen, die frei diffundiert und sehr transient an S_1 gebunden ist, kann wie folgt bestimmt werden:

$$F_{eq,1eff} = \frac{k_{2off}}{\frac{k_{2on}^*}{\gamma_{1eff}} + k_{2off}} \text{ mit} \quad \gamma_{1eff} = \frac{D}{D_{1eff}} \quad (3.25)$$

D bezeichnet das freie Diffusionsverhalten des Proteins, ohne Bindung an S_1 . Da dieser Wert jedoch experimentell nicht direkt zugänglich ist, wird er über das Diffusionsverhalten von reinem GFP, welches keine Bindungseigenschaften aufweist, und den Masseunterschied zwischen reinem GFP und dem GFP gekoppelten Protein über die Formel

$D = D_{GFP} \left(\frac{m}{m_{GFP}} \right)^{-\frac{1}{3}}$ abgeschätzt, wobei D_{GFP} wieder die über Formel 3.5 bestimmte Diffusionskonstante von reinem GFP beschreibt (siehe Abschnitt 3.2.2). m und m_{GFP} stehen für die Massen des GFP-gekoppelten Proteins und des reinen GFPs (27 kDa). Da die Bindung an S_1 im gesamten Zellkern auftritt, auch wenn die Zelle keine DNA-Schäden aufweist, und diese Bindung mit effektivem Diffusionsverhalten modelliert wird, kann D_{1eff} durch Fitten der Messungen in unbestrahlten Zellen mit Formel 3.6 bestimmt werden. Allerdings sei erwähnt, dass dies nur dann möglich ist, wenn das Diffusionsverhalten in unbestrahlten Zellen gleich dem in bestrahlten Zellen außerhalb der Foci ist. Nimmt die Bleichfleckgröße einen beträchtlichen Anteil der Zellkernfläche ein, so sollte außerdem das vom Sprague et al. (2006) beschriebene Diffusions-Reaktionsmodell mit vernachlässigbarer lokaler Bindung verwendet werden.

Damit sind bis auf k_{2on}^* und k_{2off} alle Variablen von Formel 3.21 bekannt, und nur diese beiden Parameter bleiben als Fitkonstanten. Um die Fits zu berechnen, wurde 3.21 mithilfe der "Stehfestmethode" laplacerücktransformiert zu $I(t)$. Da das beschriebene Modell auch eine Normierung der FRAP-Kurven auf 0 für den Wert nach dem Bleichen voraussetzt, und bei der hier verwendeten Normierung mit Formel 3.1 der Nullwert dem Hintergrundsignal um die Zelle entspricht, können die Daten nicht direkt mit der Laplacetransformierten $I(t)$ aus Gleichung 3.21 gefittet werden, sondern folgender weiterer Schritt ist nötig:

$$I(t) = I_\infty - \Phi + \Phi I(t) \quad (3.26)$$

Mit der schon zuvor beschriebenen Bleichtiefe Φ bezeichnet Formel 3.26 somit schließlich die Fitfunktion, welche auf die Daten angewandt werden kann. Zusammengefasst müssen R_0 , R_b , Φ , D_{1eff} , D_{GFP} , m , m_{GFP} aus anderen Messungen bestimmt werden und als Eingabe zu Verfügung stehen. Damit verbleiben dann lediglich die beiden Fitparameter k_{2on}^* und k_{2off} .

Von Sprague et al. (2006) sind zusätzlich drei vereinfachte Varianten des Modells beschrieben: (1) Wenn das Binden an S_2 vernachlässigt werden kann: "Diffusions-Reaktionsmodell mit vernachlässigbarer lokaler Bindung", (2) wenn die Diffusion vernachlässigt werden kann: "Diffusions-Reaktionsmodell reaktionsdominant", (3) wenn zusätzlich zur Bindung an S_1 auch die Bindung an S_2 im lokalen Gleichgewicht ist: "Diffusions-Reaktionsmodell mit lokalem Gleichgewicht".

Eine detaillierte Diskussion aller Modelle mit einer Übersicht in Tabelle 4.2 folgt in Abschnitt 4.2.

3.2.6 Analyse des dynamischen Verhaltens von NBS1, MDC1, 53BP1 und ATR im Zellkern nach Röntgen- und Schwerionenbestrahlung

Um die Ergebnisse zur Reparaturproteindynamik einschätzen und das Diffusions-Reaktionsgekoppelte Modell anwenden zu können, war es zunächst nötig die Diffusion von reinem GFP im Zellkern zu analysieren. Hierfür wurden die Daten mit dem reinen Diffusionsmodell, mit $I_\infty = 0,985$, dem im Abschnitt 3.2.1 bestimmten Bleichpunktradius von $\omega = 1,5 \mu m$ und einer Bleichtiefe von $\Phi = 0,6$ gefittet. Der resultierende Fit ist als rote Linie in Abbildung 3.11 zu sehen. Die so bestimmte Diffusionskonstante beträgt $12,1 \pm 0,1 \frac{\mu m^2}{s}$. Fitversuche mit dem Reaktionsbasierten Modell und einem Bindungszustand ergaben keine guten Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Der normierte quadratische Fehler des Fits lag dann bei $113,9 \cdot 10^{-6}$ im Gegensatz zu $7,7 \cdot 10^{-6}$ für das Diffusionsmodell.

NBS1

Um das dynamische Verhalten von NBS1 näher zu charakterisieren, wurde das Protein zunächst in unbestrahlten Zellen, also ohne zusätzlich Bindung in Foci untersucht. Die Daten wurden mit dem Reaktionsbasierten Modell mit einem Bindungszustand und mit dem Diffusionsmodell gefittet. Ersteres ergab nur ein mäßiges Ergebnis mit einem normierten quadratischen Fehler des Fits von $0,3 \cdot 10^{-3}$ (siehe Abbildung 3.14a), während der Diffusionsfit, mit einem normierten quadratischen Fehler von $0,1 \cdot 10^{-3}$, sehr gut passte. Hieraus ergibt sich für NBS1 in unbestrahlten Zellen eine effektive Diffusionskonstante von $0,247 \pm 0,003 \frac{\mu m^2}{s}$ (siehe Abbildung 3.14b).

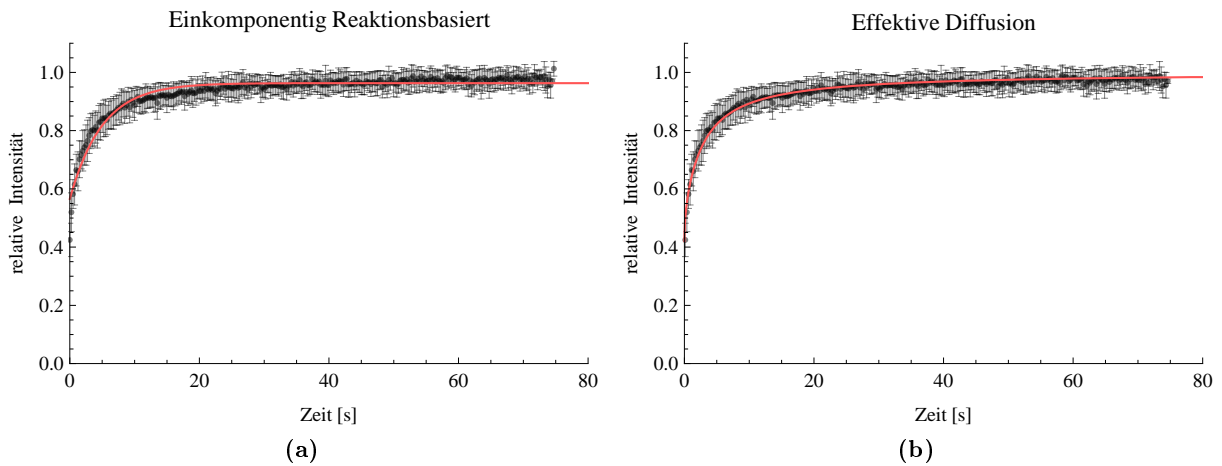


Abbildung 3.14: Reaktions- und Diffusionsfit von NBS1-GFP in unbestrahlten U2OS Zellen. (a): Einkomponenten-Reaktionsfit (b): Diffusionsfit. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Nachdem die Dynamik des NBS1 Proteins im Milieu des Kernplasmas bekannt war, konnte das Bindeverhalten von NBS1 in strahleninduzierten Foci untersucht werden. Im Zentrum der Analyse stand hierbei der Einfluss verschiedener Schadensdichten nach Schwerionenbestrahlung. Hierfür wurden FRAP Messungen in den strahleninduzierten Foci nach unterschiedlicher Bestrahlung durchgeführt. Zunächst war jedoch zu klären, ob die NBS1-Moleküle, welche nicht in den Foci binden, nach Bestrahlung noch die gleichen dynamischen Eigenschaften zeigen wie in unbestrahlten Zellen. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit Xe-Ionen ($LET = 8655 \frac{keV}{\mu m}$) schräg bestrahlt. In den anschließenden FRAP Messungen wurden nicht Foci des streifenförmigen Schadensmusters gebleicht, sondern eine beliebige Stelle außerhalb des DNA-Schadens. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.15 gezeigt (Xe nicht in Foci). Beim Vergleich dieser Messung mit der von unbestrahlten Zellen ist kein merklicher Unterschied zu erkennen.

Alle anderen Messungen aus Abbildung 3.15, in strahleninduzierten Foci, verlaufen deutlich tiefer und zeigen somit eine zusätzliche NBS1 Bindung an die Schäden. Der Verlauf dieser Kurven ist bis ca. 10 s für alle nahezu identisch. Zu längeren Zeiten laufen die Kurven jedoch leicht auseinander, wobei die Tendenz zu erkennen ist, dass mit steigendem LET (Röntgen < C < Ar < Ni < Xe < U), also mit steigender Schadensdichte die Kurven immer flacher werden.

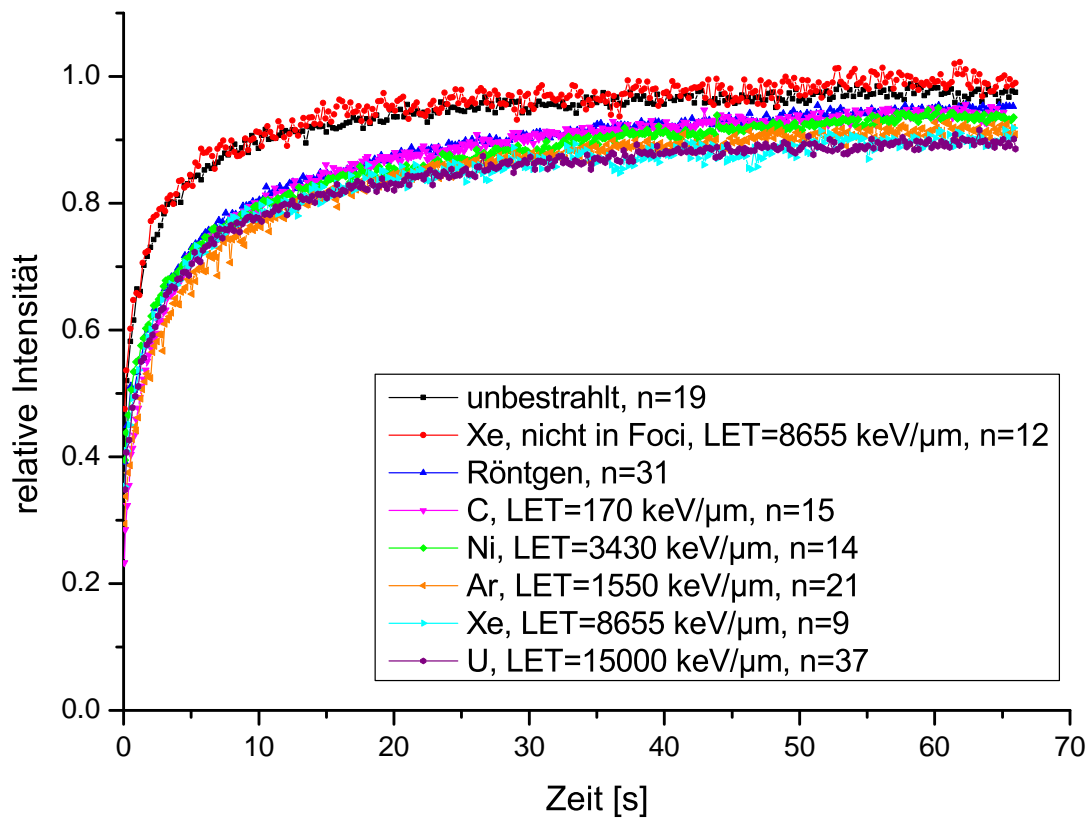


Abbildung 3.15: NBS1 Dynamik nach DNA-Schadensinduktion. FRAP Messungen von NBS1-GFP in U2OS Zellen nach Ionen- und Röntgenbestrahlung. Die Mobilität in unbestrahlten Zellen ist zum Vergleich gezeigt. "Xe nicht in Foci" beschreibt Messungen nach Xe-Ionenbestrahlung, aber nicht in Foci des DNA-Schadensteifens, sondern außerhalb dessen an beliebigen Stellen im Zellkern. Zur übersichtlicheren Darstellung sind keine Fehlerbalken gezeigt. In Abbildungen 3.14, 3.16, 3.17 und 3.21 sind die Fehlerbalken einiger Messungen eingezeichnet. Alle anderen sind vergleichbar.

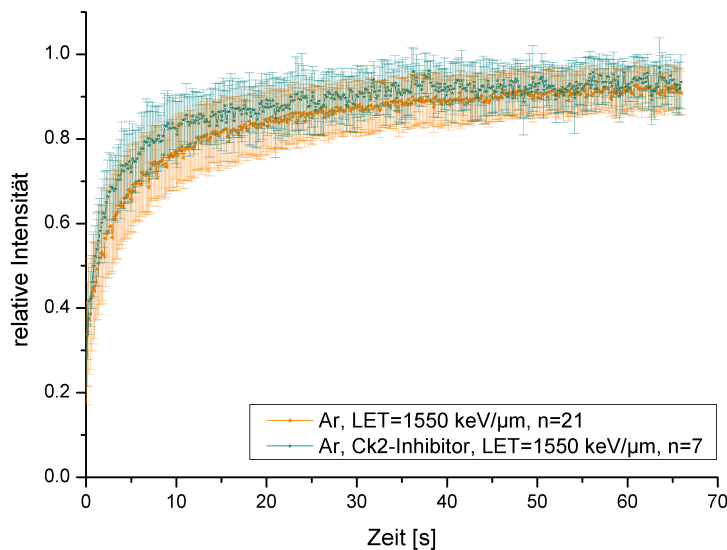


Abbildung 3.16: NBS1 Dynamik in Foci nach Ar-Ionenbestrahlung mit und ohne CK2-Inhibition. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Vergleicht man das Verhalten von NBS1 nach Ar-Ionenbestrahlung mit und ohne CK2-Inhibition durch TBB, so ist zu sehen, dass nach CK2-Inhibition die Kurve zunächst deutlich schneller ansteigt, zu späteren Zeiten aber einen flacheren Verlauf hat als die Kurve ohne Inhibition (siehe Abbildung 3.16).

Alle Kurven aus Abbildung 3.15 und 3.16, bis auf die der unbestrahlten Zellen, wurden mit dem Reaktionsbasierten und dem Diffusions-Reaktionsmodell gefittet. In allen Fällen beschrieb der einkomponentige Reaktionsfit die Daten nur sehr schlecht (Daten nicht gezeigt). Der zweikomponentige Reaktionsfit passte sich immer sehr gut in die Daten ein (Daten nicht gezeigt), jedoch betrug die Anzahl der Fitparameter hierbei 4. Die Fits des Diffusions-Reaktionsmodells sind für zwei Messungen beispielhaft in Abbildung 3.17 dargestellt. Mit der Eingabe von $D_{1eff} = 0,25 \frac{\mu m^2}{s}$ aus den Messungen der unbestrahlten Zellen, einem Bleichpunktradius von $1,5 \mu m$, einem Zellkernradius von $9,2 \mu m$ und einer Masse von NBS1 mit der Tandem-GFP-Markierung von 137 kDa passten diese Fits mit nur 2 Fitparametern sehr gut in die Messdaten. Auch für alle anderen Kurven aus Abbildung 3.15 passten diese Fits, analog zu den in Abbildung 3.17 beispielhaft gezeigten, sehr gut in die Daten (Daten nicht gezeigt).

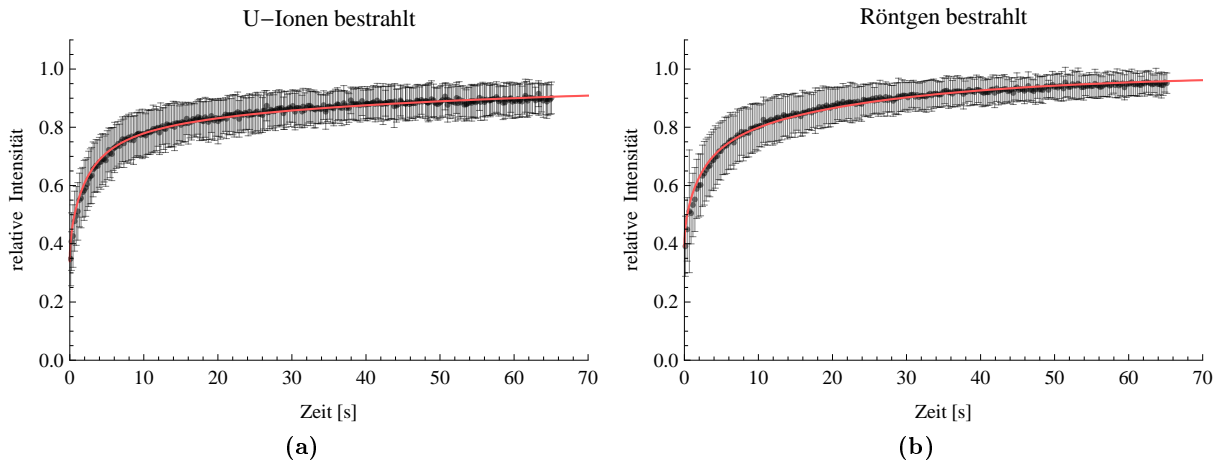


Abbildung 3.17: Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell von NBS1-GFP in U2OS Zellen nach U-Ionen- und Röntgenbestrahlung. (a): U-Ionenbestrahlung (b): Röntgenbestrahlung. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Die aus dem Diffusions-Reaktionsmodell resultierenden Fitparameter für k_{2on}^* und k_{2off} sind in Tabelle 3.1 und in Abbildung 3.18a in Abhängigkeit vom LET dargestellt. k_{2off} fällt sehr deutlich mit steigendem LET. Nach Röntgenbestrahlung betrug der Wert für k_{2off} $0,047 \frac{1}{s}$, nach Xe- und Uranionenbestrahlung $0,010 \frac{1}{s}$ und $0,011 \frac{1}{s}$. Die Werte für C-, Ar- und Ni-Ionenbestrahlung lagen mit $0,026 \frac{1}{s}$, $0,023 \frac{1}{s}$ und $0,030 \frac{1}{s}$ dazwischen. Auch für k_{2on}^* ist die Tendenz zu beobachten, dass die Werte mit steigendem LET fallen, allerdings ist die Streuung hier größer. Sie betrugen nach Röntgenbestrahlung $0,372 \frac{1}{s}$, im mittleren LET-Bereich nach C-, Ar- und Ni-Ionenbestrahlung $0,089 \frac{1}{s}$, $0,164 \frac{1}{s}$ und $0,243 \frac{1}{s}$ und bei sehr hohem LET nach Xe- und U-Ionenbestrahlung $0,071 \frac{1}{s}$ und $0,076 \frac{1}{s}$. Auffällig ist, dass nach CK2-Inhibition sowohl der Wert von $k_{2on}^* = 0,016 \frac{1}{s}$ als auch der Wert von $k_{2off} = 0,007 \frac{1}{s}$ geringer ist als ohne Inhibition.

Berechnet man $F_{eq,1eff}$ nach Formel 3.25 für die unterschiedlichen Arten der Bestrahlung so erhält man die in Tabelle 3.1 und Abbildung 3.18b gezeigten Ergebnisse. C_{2eq} bestimmt sich einfach aus $C_{2eq} = 1 - F_{eq,1eff}$. Für den gesamten LET-Bereich liegen die Werte für $F_{eq,1eff}$

zwischen 0,78 und 0,80, lediglich die der C-Ionenbestrahlung und die der Ar-Bestrahlung mit CK2-Inhibition liegen deutlich höher bei 0,89 und 0,93.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell. $F_{eq,1eff}$ ist nach Formel 3.25 aus k_{2on}^* , k_{2off} und γ_{1eff} bestimmt.

Bestrahlung	LET [$\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$]	k_{2on}^* [$\frac{1}{\text{s}}$]	k_{2off} [$\frac{1}{\text{s}}$]	$F_{eq,1eff}$
Röntgen	1	$0,372 \pm 0,024$	$0,047 \pm 0,002$	$0,78 \pm 0,01$
C-Ionen	170	$0,089 \pm 0,004$	$0,026 \pm 0,001$	$0,89 \pm 0,01$
Ar-Ionen	1550	$0,164 \pm 0,008$	$0,023 \pm 0,001$	$0,80 \pm 0,01$
Ni-Ionen	3430	$0,243 \pm 0,008$	$0,030 \pm 0,001$	$0,78 \pm 0,01$
Xe-Ionen	8655	$0,071 \pm 0,005$	$0,010 \pm 0,001$	$0,80 \pm 0,02$
U-Ionen	15000	$0,077 \pm 0,004$	$0,011 \pm 0,001$	$0,80 \pm 0,02$
Ar-Ionen, CK2 inhibiert	1550	$0,016 \pm 0,004$	$0,007 \pm 0,001$	$0,93 \pm 0,02$

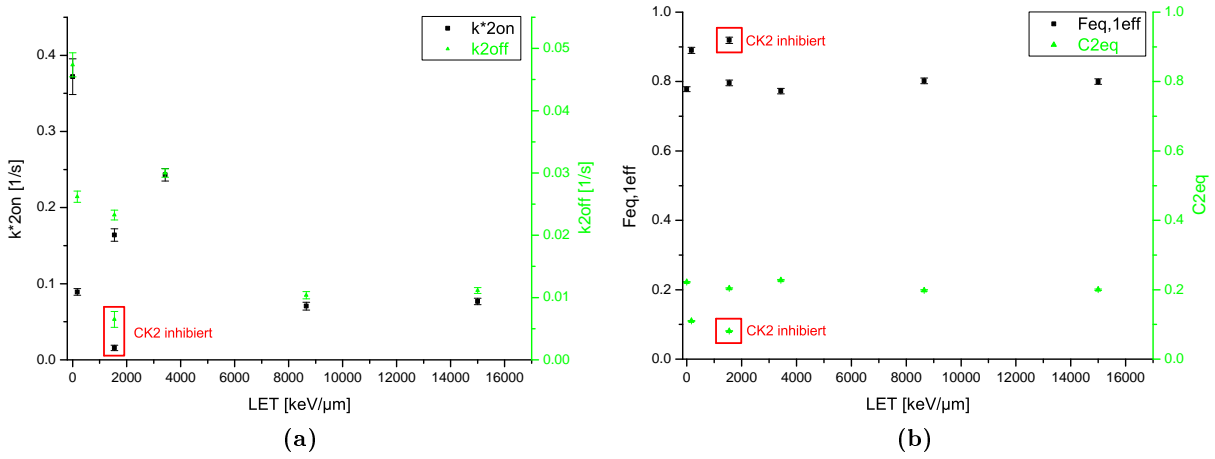


Abbildung 3.18: Fitparameter des Diffusions-Reaktionsmodells in Abhängigkeit des LET. (a): k_{2on}^* und k_{2off} in Abhängigkeit des LET nach verschiedenen Arten der Bestrahlung (b): Der aus k_{2on}^* und k_{2off} bestimmte offensichtliche Diffusion- und Bindungsanteil ($F_{eq,1eff}$ und C_{2eq}) in Abhängigkeit des LET nach verschiedenen Arten der Bestrahlung. Fehlerbalken: Asymptotischer Standardfehler.

Die CK2-Inhibition führte zu deutlich verringerten Werten von k_{2on}^* und k_{off} . Außerdem änderte sich die Morphologie der NBS1 Foci (siehe Abbildung 3.19). Mit Inhibition waren sie deutlich schwächer und zeigten eine kleinere und feinere Struktur. Die MDC1-Focistruktur änderte sich jedoch nicht.

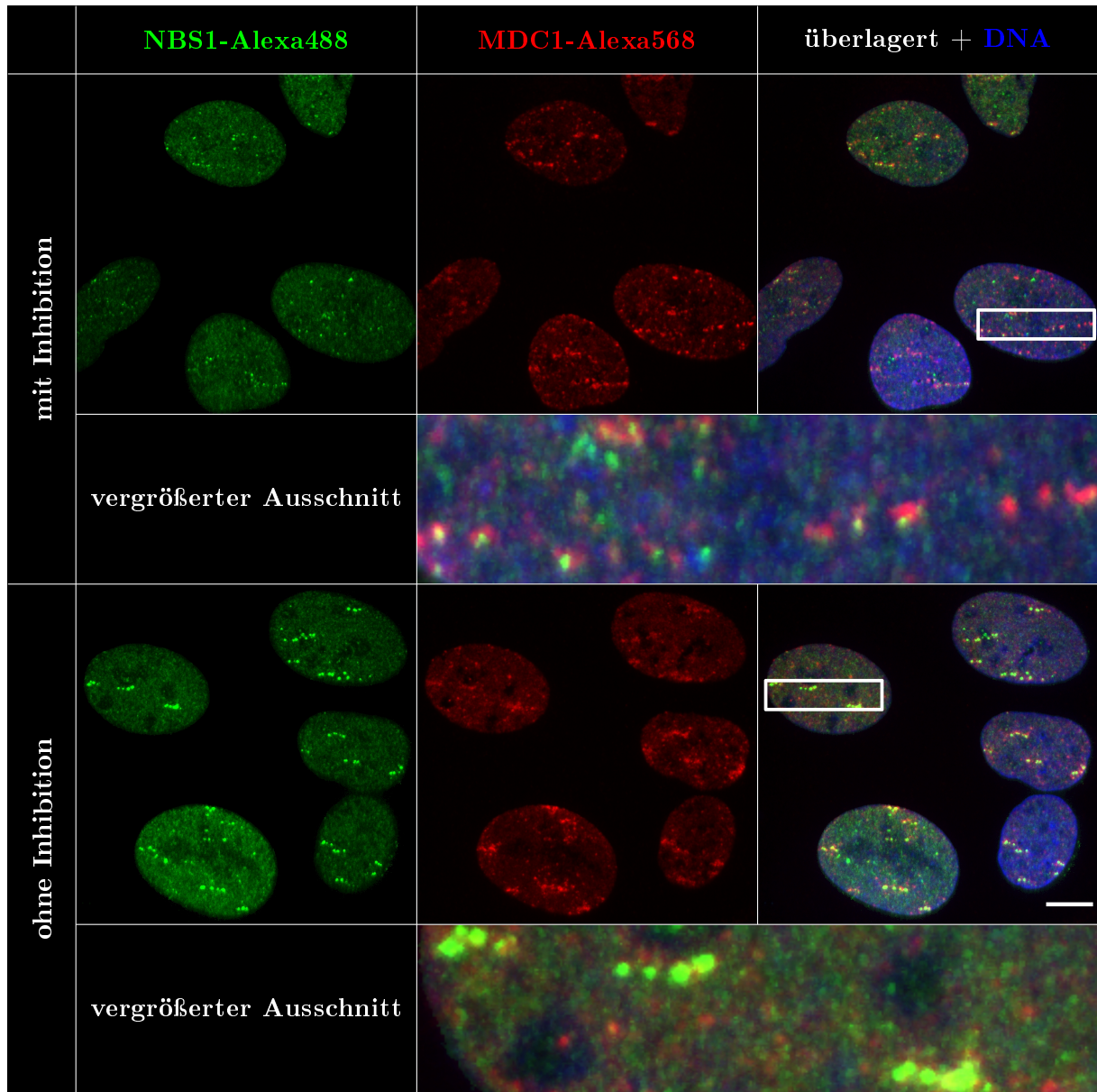


Abbildung 3.19: Immunfluoreszenzfärbung von NBS1 und MDC1 nach Au-Ionenbestrahlung mit und ohne CK2-Inhibitor. U2OS-Zellen wurden 10 min nach Au-Ionenbestrahlung mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend immunzytochemisch mit Alexa488 gegen NBS1 und mit Alexa568 gegen MDC1 (rot) gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Maßstab 10 μ m.

Eine quantitative Analyse der absoluten Fociintensität ist sehr schwierig, da sie durch viele Faktoren wie Expressionslevel der Zelle, Anregungsintensität und Aufnahmesensitivität beeinflusst wird. Aus diesen Gründen wurde auf diesen Aspekt der Auswertung fast völlig verzichtet. Zur Interpretation der Ergebnisse wurde trotzdem das Verhältnis der mittleren Fociintensität zur mittleren Intensität des gesamten Zellkerns bestimmt. Nach den oben aufgeführten Annahmen entspricht die Focigröße der Bleichpunktgröße. Folglich wurden die mittleren Intensitäten des gebleichten Punkts und des gesamten Zellkerns vor dem Bleichen, wie in Abbildung 3.10o gezeigt, berechnet. Das so bestimmte Verhältnis $V_{Zelle,Foci} = \frac{I_{Zelle}}{I_{Fokus}}$ nach U-Ionenbestrahlung betrug $0,65 \pm 0,06$. Setzt man voraus, dass gleiche Anteile der offensichtlich freien Fraktion (tatsächlich freien

und an S_1 transient gebundenen) und der in den Foci zusätzlich gebundenen Fraktion gebleicht wurden, so entspricht $V_{Zelle,Foci} F_{eq,1eff}$. Durch diese experimentelle Abschätzung verbleibt mit Formel 3.25 nur noch ein freier Fitparameter, nämlich k_{2on}^* oder k_{2off} . Unabhängig ob k_{2on}^* oder k_{2off} gefittet wird, bleibt die Fitqualität gleich (identische mittlere quadratische Abweichung). Der resultierende Fit kann die experimentellen Daten nicht gut beschreiben (siehe Abbildung 3.20).

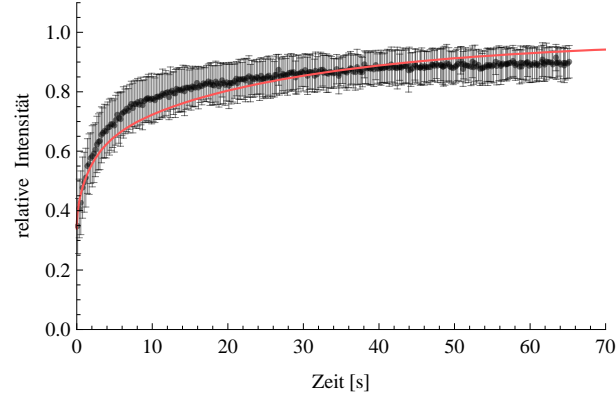


Abbildung 3.20: Fit der Messung nach U-Ionenbestrahlung mit festgelegtem $V_{Zelle,Foci}$ und damit nur einem freien Fitparameter. Fitten von k_{2on}^* oder k_{2off} führt zur identischen Kurve. Fehlerbalken: Standardabweichungen.

Um das Fitverhalten des Diffusions-Reaktionsmodells besser zu verstehen, wurden gleiche Datenreihen in voller Länge (65 s) und gekürzt (50 s und 30 s) gefittet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.21 für die Kurven nach C-Ionen- und U-Ionenbestrahlung gezeigt. Alle Fits passen sich gut in die Daten ein, allerdings hat die Messdatenlänge einen deutlichen Einfluss auf die Fitergebnisse. Dies ist in Tabelle 3.2 aufgeführt. Mit abnehmender Messdatenlänge nehmen k_{2on}^* und k_{2off} im C-Ionen und U-Ionen bestrahlten Fall deutlich zu.

Tabelle 3.2: NBS1-Bindungskonstanten aus den in Abbildung 3.21 gezeigten Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell.

Bestrahlung	Messdaten für Zeitraum	$k_{2on}^* \left[\frac{1}{s} \right]$	$k_{2off} \left[\frac{1}{s} \right]$
U-Ionen	0-65 s	$0,077 \pm 0,004$	$0,011 \pm 0,001$
	0-50 s	$0,106 \pm 0,007$	$0,015 \pm 0,001$
	0-30 s	$0,174 \pm 0,019$	$0,022 \pm 0,002$
C-Ionen	0-65 s	$0,089 \pm 0,004$	$0,026 \pm 0,001$
	0-50 s	$0,114 \pm 0,007$	$0,032 \pm 0,001$
	0-30 s	$0,176 \pm 0,016$	$0,045 \pm 0,003$

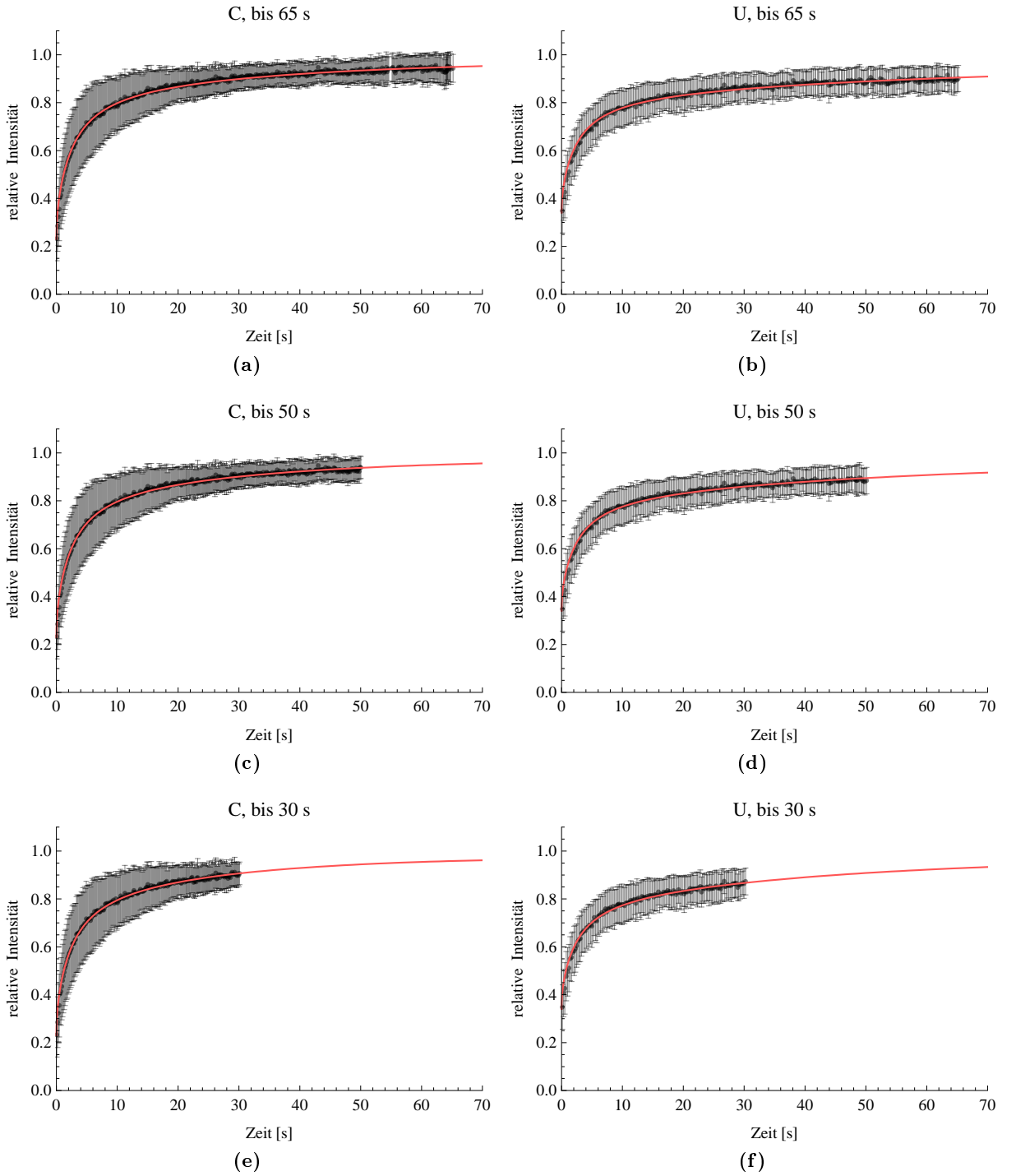


Abbildung 3.21: Einfluss der Messdatenlänge auf das Fitergebnis. Die in Abbildung 3.15 gezeigten NBS1 FRAP Kurven nach C- und U-Ionenbestrahlung wurden zusätzlich auf 50 s und 30 s gekürzt und jeweils mit dem Diffusions-Reaktionsmodell gefittet.

MDC1

Wie bereits zuvor beschrieben, zeigte MDC1 im Vergleich zu NBS1 und ATR in unbestrahlten Zellen eine deutlich langsamere Intensitätszunahme in den FRAP-Experimenten (siehe Abbildung 3.12). Zur quantitativen Analyse wurden auch diese Daten mit dem effektiven Diffusionsmodell gefittet. Der Fit passte sich hierbei gut in die Daten ein (siehe Abbildung 3.22a). Allerdings zu Beginn der Kurve bis ca. 40 s, zeigte der Fit eine leichte systematische Abweichung von den Daten (siehe Abbildung 3.22b). Unter diesen Voraussetzungen wurde eine effektive Diffusionskonstante D_{eff} von $0,0288 \pm 0,0003 \frac{\mu m^2}{s}$ bestimmt. Der Fit hatte hierbei eine normierte quadratische Abweichung von $0,42 \cdot 10^{-3}$. Versuche die Daten mit dem einkomponentigen Reaktionsbasierten Modell zu beschreiben, führten nicht zum Erfolg. Der Fit zeigte mit einer normierten quadratischen Abweichung von $2,6 \cdot 10^{-3}$ einen von den Daten völlig abweichenden Verlauf (Daten nicht gezeigt). Erst durch das Hinzufügen der zweiten Bindung konnte mit dem zweikomponentigen Reaktionsbasierten Modell ein guter Fit erzeugt werden, mit einer normierten quadratischen Abweichung, ähnlich zu der des Diffusionsfits von $0,41 \cdot 10^{-3}$ (Daten nicht gezeigt).

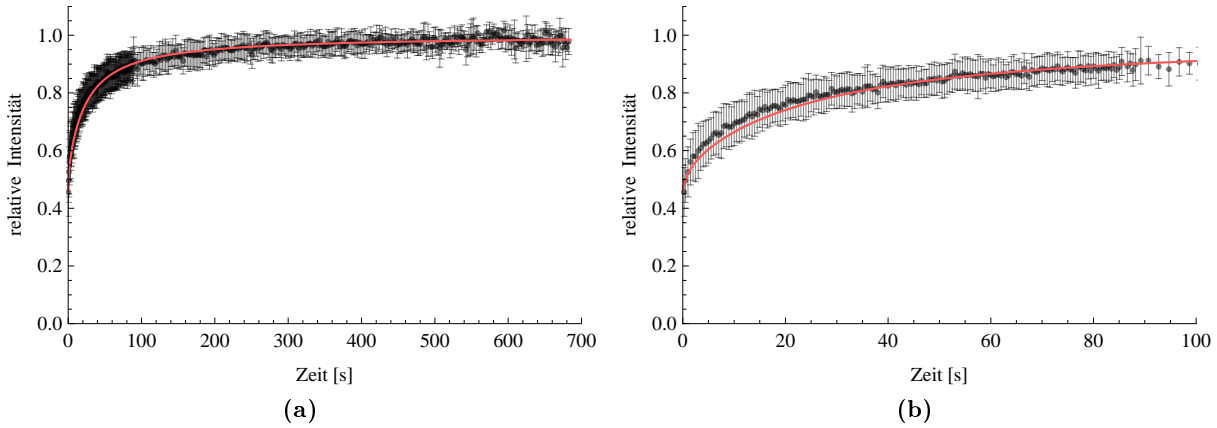


Abbildung 3.22: FRAP Messungen von MDC1-GFP in unbestrahlten U2OS-Zellen mit Diffusionsfit. (a): Messung über den gesamten Zeitraum von ca. 700 s (b): Vergrößerter Ausschnitt aus (a) mit Darstellung bis 100 s. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Nach der Analyse der Proteinmobilität in unbestrahlten Zellen, wurde schließlich das Bindeverhalten von MDC1 nach DNA-Schadensinduktion bei verschiedenen Arten der Bestrahlung untersucht. Abbildung 3.23 stellt die Ergebnisse im Überblick dar, wobei die zuvor analysierte Kurve der unbestrahlten Zellen zum Vergleich aufgezeigt ist. Das Bindeverhalten von MDC1 wurde nach C-, Ru-, Au-Ionenbestrahlung und nach Röntgenbestrahlung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass MDC1 nach Bestrahlung mit den sehr schweren Ru- oder Au-Ionen nicht nur in den Foci, sondern auch im gesamten Zellkern eine verminderte Mobilität zeigte (entsprechende Messungen sind mit "nicht in Foci" gekennzeichnet).

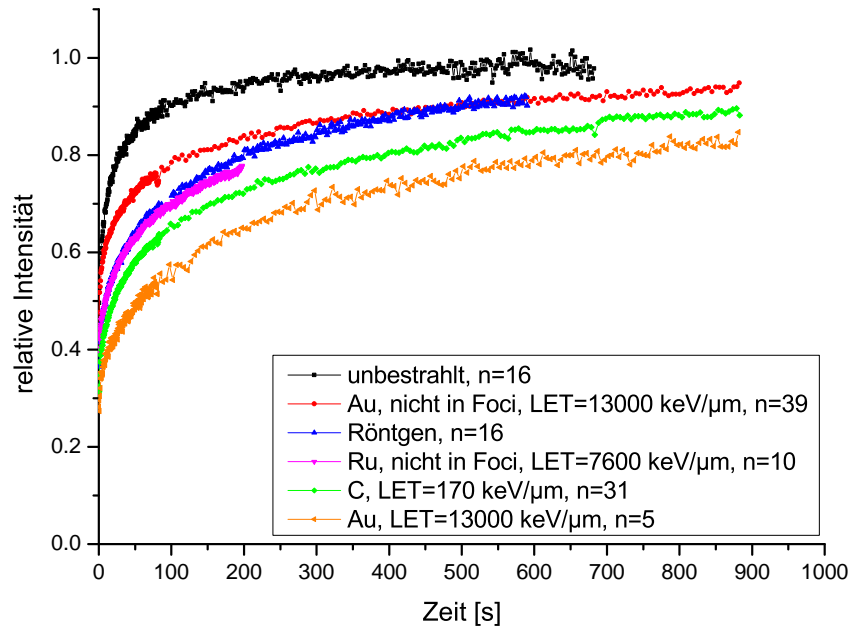


Abbildung 3.23: MDC1-GFP Dynamik in U2OS Zellen nach DNA-Schadensinduktion mit Röntgen- und Ionenbestrahlung. Die Messung in unbestrahlten Zellen ist zum Vergleich gezeigt. "Nicht in Foci" beschreibt FRAP Messungen nach Ionenbestrahlung, aber nicht in Foci des Streifens, sondern außerhalb an beliebigen Stellen im Zellkern. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden keine Fehlerbalken gezeigt. Diese sind in den Abbildungen 3.22, 3.24, 3.25 und 3.27 für die einzelnen Kurven dargestellt.

In die folgende quantitative Analyse der Daten wurde die Messung nach Ru-Ionenbestrahlung nicht mit aufgenommen, da diese deutlich kürzer, bis nur ca. 200 s, gemessen wurde. Zum besseren Vergleich wurden alle anderen Daten nach Röntgen-, C-Ionen- und Au-Ionenbestrahlung einheitlich bis 590 s gefittet. Die Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell sind in Abbildung 3.24 aufgezeigt mit den entsprechenden resultierenden Fitparametern in Tabelle 3.3. Hierzu wurde für D_{1eff} der Wert aus den Messungen unbestrahlter Zellen verwendet. Außerdem wurde der Zellkernradius auf $9,6 \mu\text{m}$ bestimmt und es wurde eine Proteinmasse von 257 kDa angenommen. Das Modell beschreibt die Messungen nach Röntgen- und C-Ionenbestrahlung in Foci gut (siehe Abbildung 3.24a und 3.24b). Der Fit für die Foci-Messungen nach Au-Ionenbestrahlung weicht aber von den Messdaten ab (siehe Abbildung 3.24c). Dieser Fit verläuft zwischen 100 s und 400 s unter den Daten und danach über den Daten. Diese Tendenz war auch in den anderen Messungen in Abbildungen 3.24a und 3.24b leicht zu erkennen, aber deutlich weniger ausgeprägt. Die vereinfachten Varianten dieses Diffusions-Reaktionsmodells ergaben bei vernachlässigter Diffusion in keinem Fall einen akzeptablen Fit und auch bei angenommenem lokalem Gleichgewicht an S_2 waren die Fits sehr schlecht.

Das Reaktionsbasierte Modell mit einer Komponente passte in keinem Fall in den schnellen Anstieg am Anfang der Kurven. Aber auch für den verbleibenden langsamen Verlauf passte die Krümmung dieser Fits nicht in die Messdaten. Am Anfang und Ende der Kurven traten immer eindeutige systematische Abweichungen auf (Daten nicht gezeigt). Erst durch das Einführen eines zusätzlichen Bindungszustandes konnten die Kurven mit dem Reaktionsbasierten Modell gut beschrieben werden (Daten nicht gezeigt).

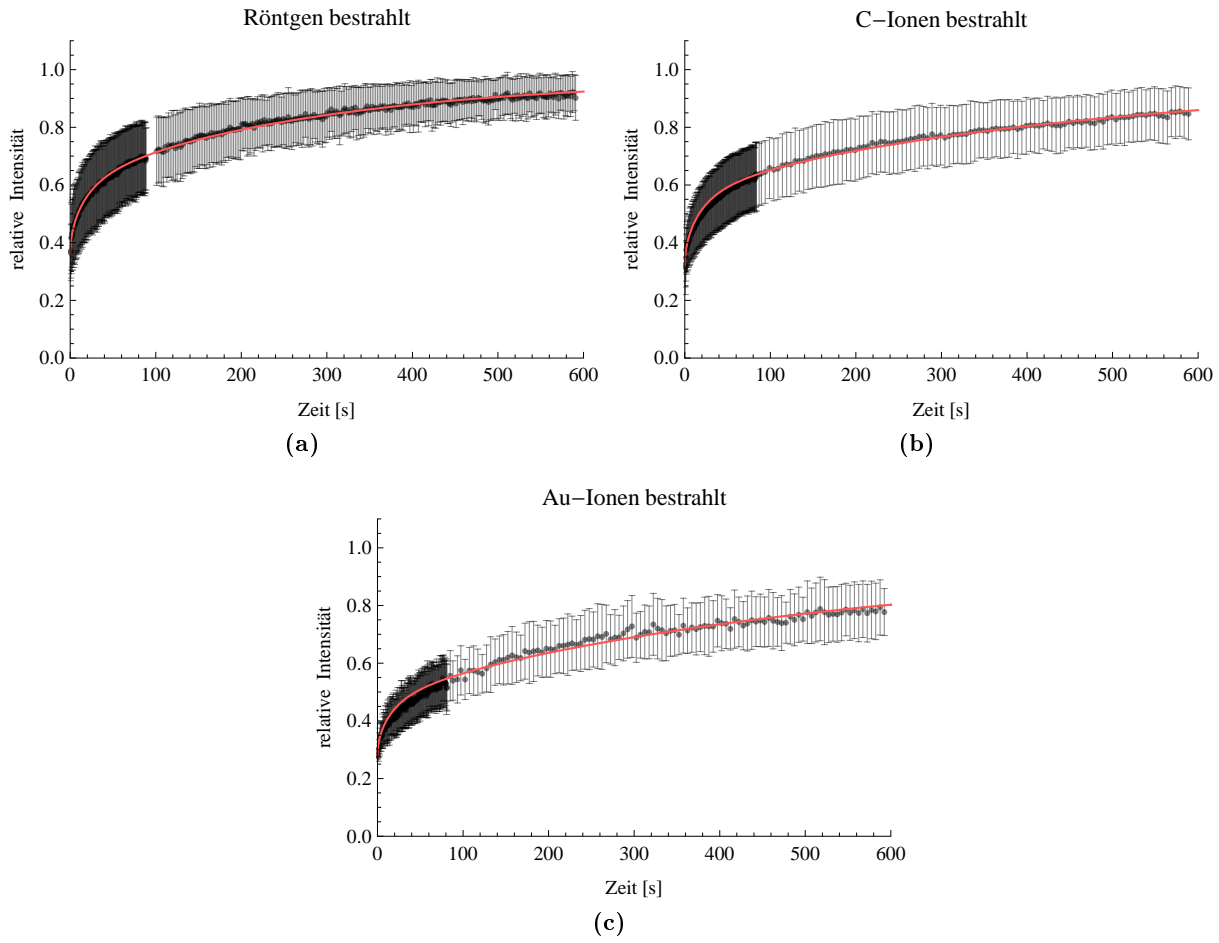


Abbildung 3.24: Fits der in Abbildung 3.23 gezeigten Messungen mit dem Diffusions-Reaktionsmodell. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Tabelle 3.3: Fitergebnisse der Messungen in Foci aus Abbildungen 3.24, 3.27a, 3.27b und 3.30 mit dem Diffusions-Reaktionsmodell.

Bestrahlung	Inhibition	LET [$\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$]	$k_{2\text{on}}^* [\frac{1}{\text{s}}]$	$k_{2\text{off}} [\frac{1}{\text{s}}]$	$F_{\text{eq,1eff}}$
Röntgen	-	1	$0,587 \pm 0,013$	$0,00425 \pm 0,00006$	$0,59 \pm 0,01$
C-Ionen	-	170	$0,394 \pm 0,009$	$0,00230 \pm 0,00004$	$0,53 \pm 0,01$
Au-Ionen	-	13000	$0,587 \pm 0,022$	$0,00213 \pm 0,00005$	$0,42 \pm 0,01$
Au-Ionen	ATM + DNA-PK	13000	$0,303 \pm 0,008$	$0,00171 \pm 0,00003$	$0,53 \pm 0,01$
Ar-Ionen	-	1550	$0,904 \pm 0,017$	$0,00206 \pm 0,00003$	$0,31 \pm 0,01$
Ar-Ionen	CK2	1550	$0,193 \pm 0,010$	$0,00078 \pm 0,00004$	$0,44 \pm 0,02$

Da das Diffusions-Reaktionsmodell auf der bestimmten Proteinmobilität in unbestrahlten Zellen bzw. außerhalb des Fokus beruht und sich diese, wie gezeigt, nach Bestrahlung mit sehr schweren Ionen ändert, wurde versucht diese veränderte Mobilität mit dem effektiven Diffusionsfit zu bestimmen. Der neue Parameter für D_{eff} könnte dann als korrigierte Eingabe für den Fit der Foci-Messungen nach sehr schweren Ionen dienen, und diese möglicherweise verbessern. Es zeigte sich aber, dass die Messung der MDC1-Mobilität nach Au-Ionenbestrahlung, außerhalb von Foci, nicht mit dem Diffusionsmodell beschrieben werden konnte. Der Fit passte, wie in Abbildung 3.25a zu sehen, nicht in die Daten. Eine mögliche Ursache für das schlechte Fitergebnis könnte sein, dass das effektive Diffusionsmodell nur sehr schnelle Bindungen beschreiben kann. Aus diesem Grund wurden die Daten auch mit dem Diffusionsmodell mit einer Bindung gefittet. Hierbei wurde für die Diffusion der Wert angenommen, der in unbestrahlten Zellen ermittelt wurde, also $D_{eff}=0,029 \frac{\mu m^2}{s}$. Der resultierende Fit beschreibt die Daten sehr gut (siehe Abbildung 3.25b). Das Fitergebnis für k_{2on}^* und k_{2off} ist in Tabelle 3.4 (obere Zeile) gelistet.

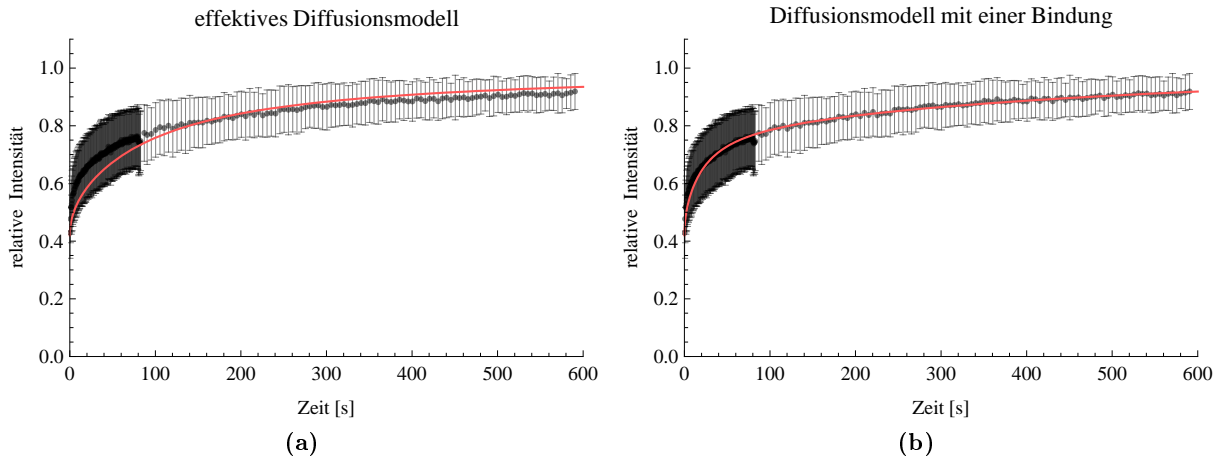


Abbildung 3.25: Fit der in Abbildung 3.23 gezeigten Messung nach Au-Ionenbestrahlung, nicht in Foci, mit dem (a): Diffusionsmodell und dem (b): Diffusionsmodell mit einer Bindung. Für das Diffusionsmodell mit einer Bindung wurde die effektive Diffusionskonstante $D_{eff}=0,029 \frac{\mu m^2}{s}$ aus den Messungen der unbestrahlten Zellen eingesetzt. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Tabelle 3.4: Fitergebnisse der Messungen nicht in Foci aus Abbildungen 3.25b, 3.27c und 3.27d mit dem Diffusionsmodell mit einer Bindung.

Bestrahlung	Inhibition	LET [$\frac{keV}{\mu m}$]	$k_{2on}^* [\frac{1}{s}]$	$k_{2off} [\frac{1}{s}]$
Au-Ionen	-	13000	$0,00074 \pm 0,00002$	$0,00193 \pm 0,00004$
Au-Ionen	ATM + DNA-PK	13000	$0,00042 \pm 0,00002$	$0,00197 \pm 0,00008$

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Kinasen CK2 und ATM zusammen mit DNA-PK auf die MDC1-Bindung untersucht. Hierbei wurden, wie im Abschnitt 2.1.6 beschrieben, die speziellen Inhibitoren TBB und KU55933 zusammen mit IC86621 angewandt. Bei gleichzeitiger Inhibition von ATM und DNA-PK änderte sich der Kurvenverlauf der Messungen in Foci und

außerhalb der Foci nach Au-Ionenbestrahlung leicht (siehe Abbildung 3.26). In beiden Fällen verläuft die Kurve bei Inhibition etwas höher. Die Messungen mit Inhibition ließen sich etwas besser mit dem Diffusions-Reaktionsmodell beschreiben. Dennoch war der Fit auch nach Inhibition nicht optimal (vergleiche Abbildungen 3.27a und 3.27b). Die Fitergebnisse sind in Tabelle 3.3 gezeigt. In weiteren Fitversuchen zeigte sich, dass auch die Kurven mit Inhibition nicht mit den vereinfachten Varianten des Diffusions-Reaktionsmodells beschrieben werden konnten (Daten nicht gezeigt). Analog zu den Messungen ohne Inhibitor, ließen sich auch die Messungen mit Inhibitor außerhalb der Foci gut mit dem Diffusionsmodell mit einer Bindung beschreiben (siehe Abbildungen 3.27c und 3.27d). Diese Fitergebnisse sind in Tabelle 3.4 gelistet.

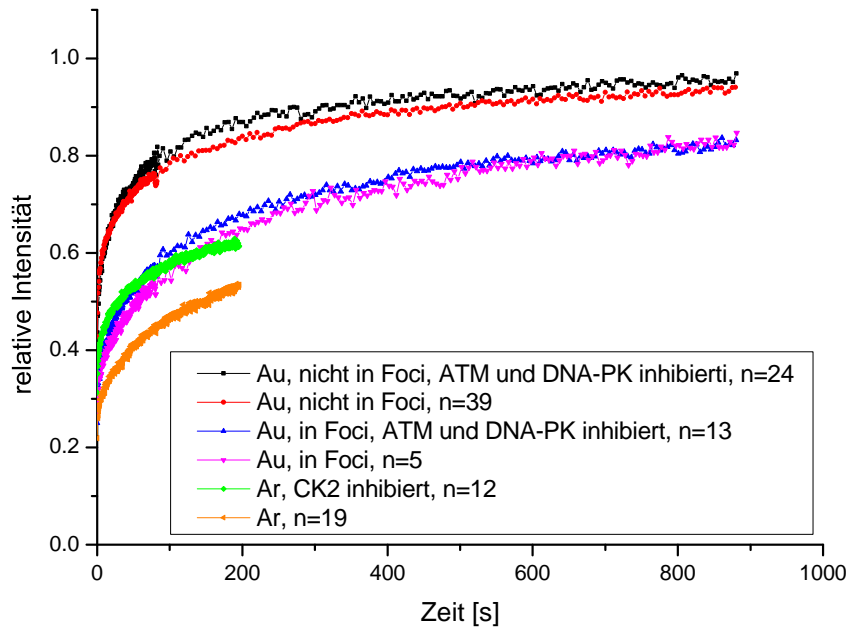


Abbildung 3.26: MDC1-GFP FRAP-Messungen in U2OS-Zellen nach Ionenbestrahlung ohne und mit CK2-Inhibition oder ATM- und DNA-PK Doppelinhibition. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden keine Fehlerbalken gezeigt. Diese sind in den Abbildungen 3.27 und 3.30 dargestellt.

Um die verringerte MDC1-Mobilität im gesamten Zellkern nach Bestrahlung mit sehr schweren Ionen besser zu verstehen, wurden nach Zellfixierung mit Paraformaldehyd immunzytochemische Färbungen gegen γ H2AX durchgeführt, da MDC1 an dieses binden kann. Die Zellen wurden dafür entweder mit Au-Ionen in "Streifengeometrie" oder mit Röntgenstrahlung bestrahlt. Außerdem wurden die Kinasen ATM und DNA-PK, deren Aktivität zur γ H2AX-Bildung führt, inhibiert. Die Ergebnisse nach Au-Ionenbestrahlung sind in Abbildung 3.28, die nach Röntgenbestrahlung in Abbildung 3.29 gezeigt. MDC1 wurde zusätzlich immunzytochemisch mit dem Farbstoff Alexa568 markiert. Im Fall der Au-Ionenbestrahlung führt die Inhibition zu einem deutlicher erkennbaren Schadensmuster. Sowohl MDC1 als auch γ H2AX bildet nach Inhibition kontrastreichere Streifen. Für die durch Röntgenbestrahlung induzierten Foci zeigt sich ein anderes Bild. Diese werden durch die Inhibition in allen drei Färbungen schwächer, und der Anteil der Zellen mit strahleninduzierten Foci verringert sich.

Wie in Abbildung 3.26 zu sehen, führte die CK2-Inhibition bei Ar-Ionenbestrahlung zu einer sehr deutlichen Verschiebung der FRAP Kurve nach unten. Diese Messungen reichen nur bis 200s, trotzdem konnten beide Kurven, wie alle anderen MDC1 Messungen zuvor, weder mit dem einkomponentigen Reaktionsbasierten Modell, noch mit den vereinfachten Varianten

des Diffusions-Reaktionsmodells beschrieben werden. Lediglich die Fits des nicht vereinfachten Diffusions-Reaktionsmodells passten sich, wie in Abbildung 3.30 zu sehen, mit nur kleinen Abweichungen in die Daten ein. Die resultierenden Fitparameter sind in Tabelle 3.3 gelistet. Durch die CK2 Inhibition verringerten sich k_{2on}^* und k_{2off} deutlich. $F_{eq,1eff}$ stieg dadurch von 0,31 auf 0,44 an.

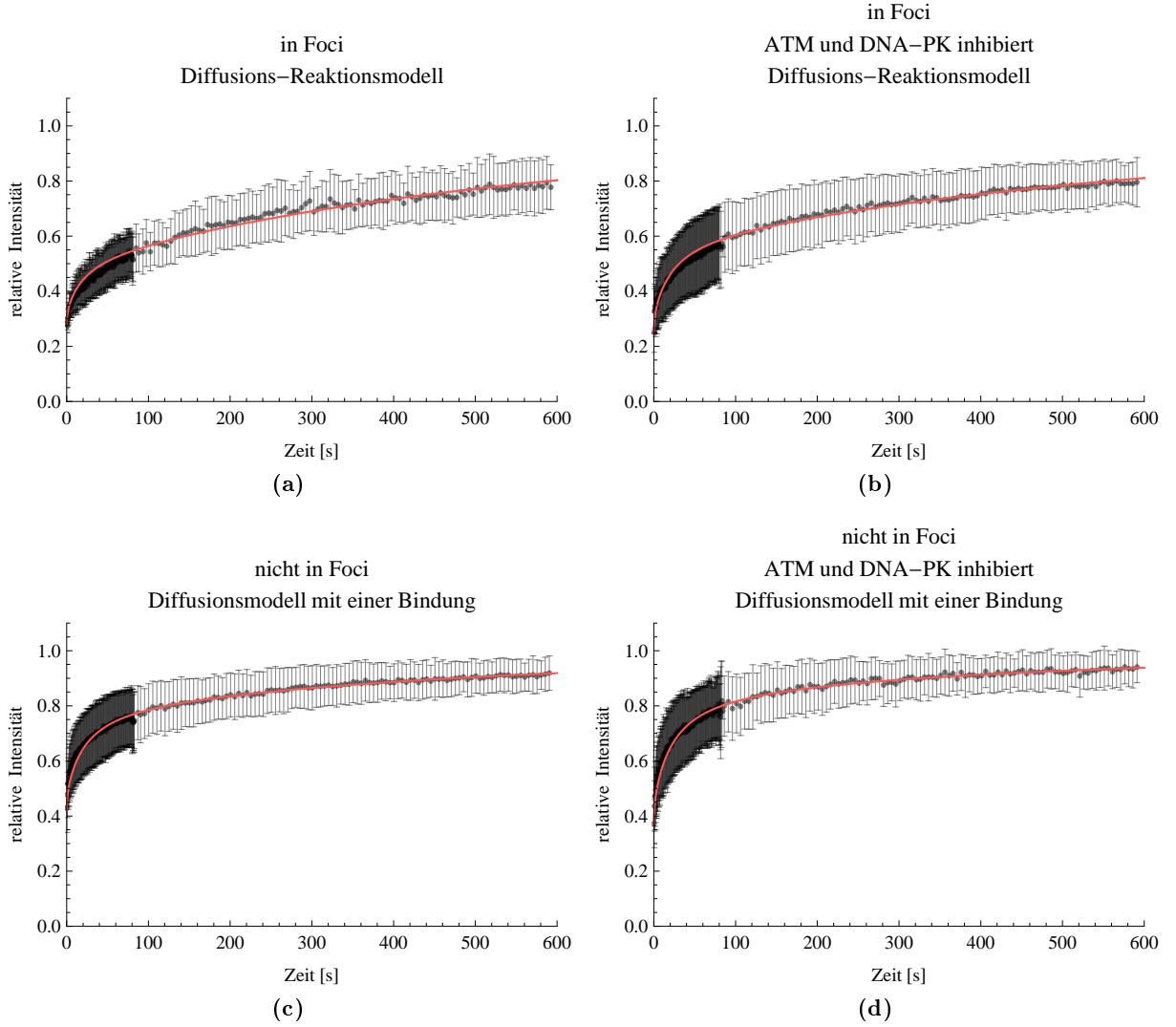


Abbildung 3.27: Fits der in Abbildung 3.26 gezeigten Messungen nach Au-Ionenbestrahlung ohne und mit ATM und DNA-PK Inhibition. (a) und (b): Messungen in Foci, gefittet mit dem Diffusions-Reaktionsmodell. (c) und (d): Messungen nicht in Foci, gefittet mit dem Diffusionsmodell mit einer Bindung. Die effektive Diffusionskonstante $D_{eff}=0,029 \frac{\mu m^2}{s}$ aus den Messungen der unbestrahlten Zellen wurde eingesetzt. Fehlerbalken: Standardabweichung.

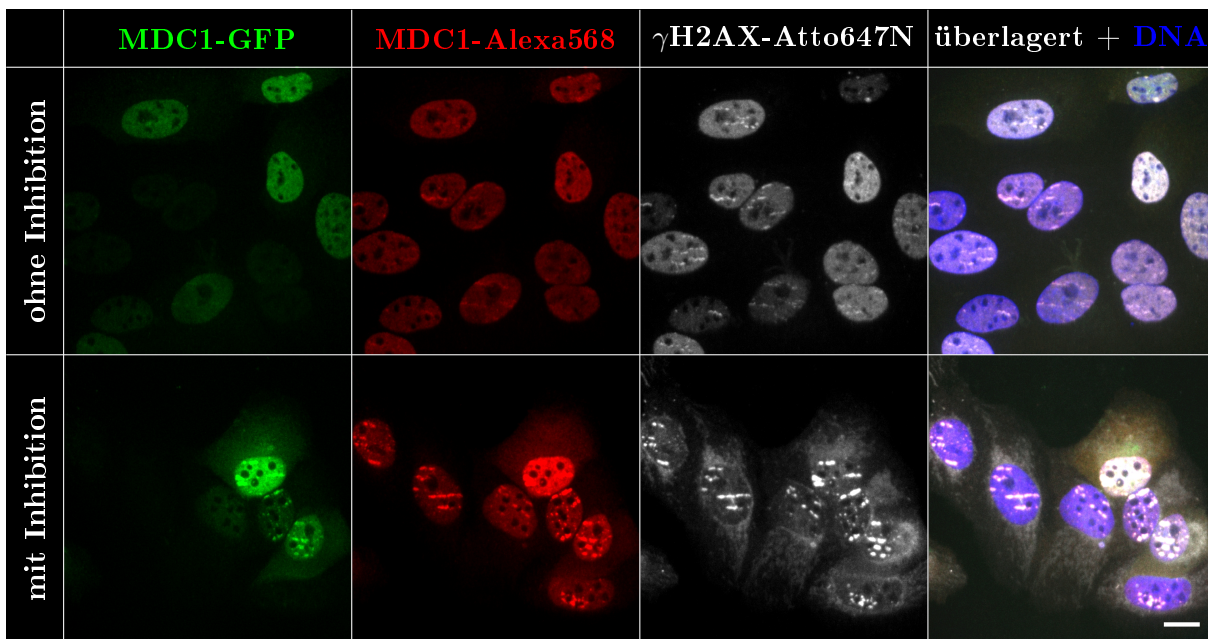


Abbildung 3.28: Immunfluoreszenzfärbung von MDC1 und γ H2AX nach Au-Ionenbestrahlung ohne und mit ATM- und DNA-PK-Doppelinhibition. U2OS-Zellen, stabil transfiziert mit MDC1-GFP (grün), wurden 1 h nach Au-Ionenbestrahlung mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend immunzytochemisch mit Alexa568 gegen MDC1 (rot) und mit Atto647N gegen γ H2AX (grau) gefärbt. DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Zur besseren Darstellung des gesamten Intensitätsbereichs sind die Bilder mit einer Gammakorrektur von 0,7 dargestellt. Maßstab 10 μ m.

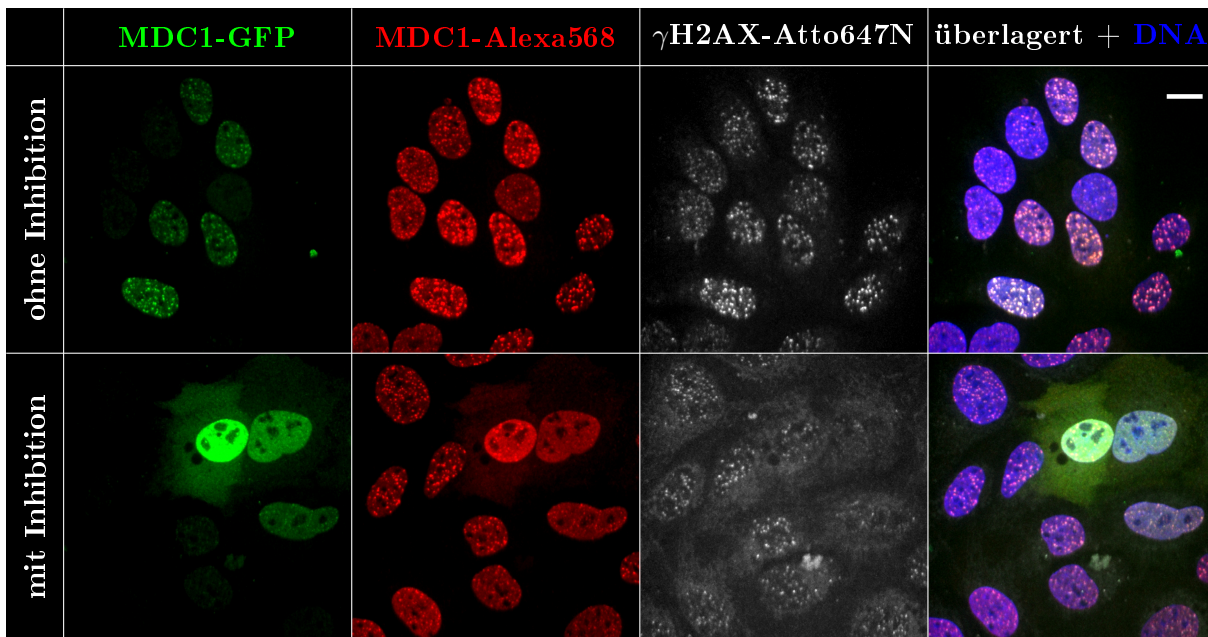


Abbildung 3.29: Immunfluoreszenzfärbung von MDC1 und γ H2AX nach 2 Gy Röntgenbestrahlung ohne und mit ATM- und DNA-PK-Doppelinhibition. U2OS-Zellen, stabil transfiziert mit MDC1-GFP (grün), wurden 1 h nach Röntgenbestrahlung mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend immunzytochemisch mit Alexa568 gegen MDC1 (rot) und mit Atto647N gegen γ H2AX (grau) gefärbt. DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Zur besseren Darstellung des gesamten Intensitätsbereichs sind die Bilder mit einer Gammakorrektur von 0,7 dargestellt. Maßstab 10 μ m.

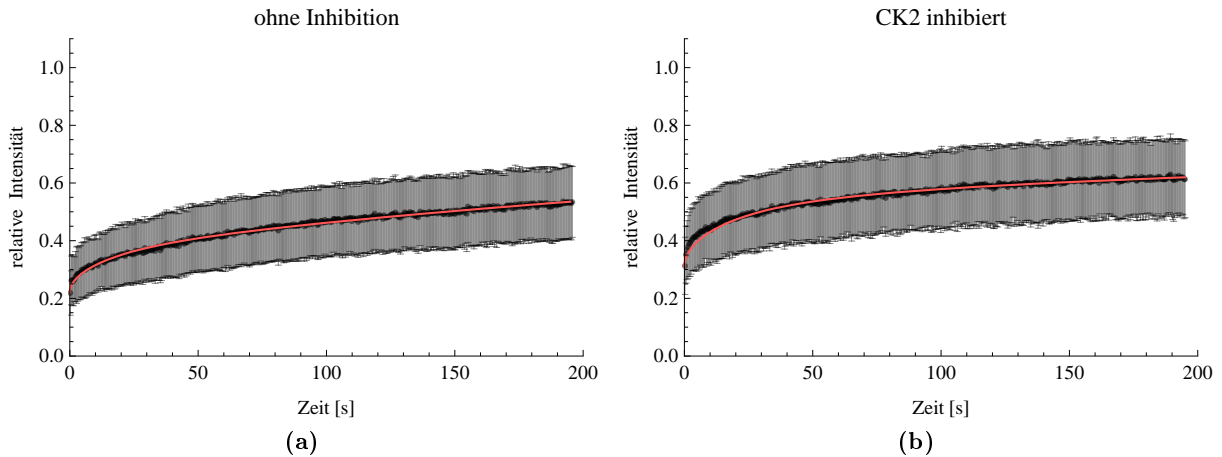


Abbildung 3.30: Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell der in Abbildung 3.26 gezeigten Messungen nach Ar-Ionenbestrahlung ohne und mit CK2 Inhibition. Fehlerbalken: Standardabweichung.

53BP1

Die Fitanalyse der 53BP1-Mobilität im Kern unbestrahlter Zellen erwies sich als schwierig. Zunächst zeigte sich, dass mit dem Diffusionsfit die Daten nicht gut beschrieben werden konnten. Sowohl zu Beginn der Messkurve, als auch am Ende wich der Fit stark von den Messdaten ab. Nachdem I_∞ von 1,00 auf 0,97 reduziert wurde, konnte der Fit den späten leichten Anstieg der Kurve beschreiben (siehe Abbildung 3.31a), aber zu kurzen Zeiten gab es noch immer Abweichungen, was in einer vergrößerten Darstellung bis 100 s in Abbildung 3.31b gezeigt ist. Die so bestimmte Diffusionskonstante betrug $D_{eff} = 0,0125 \pm 0,0002 \frac{\mu m^2}{s}$ für einen Bleichpunktradius von $\omega = 1,5 \mu m$. Auch die Analyse mit dem einkomponentigen Reaktionsmodell ergab deutliche Abweichungen und keine guten Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Der Versuch die Daten mit dem Diffusionsmodell mit einer Bindung zu beschreiben ergab, dass die Werte für k_{on}^* und k_{off} nicht explizit, sondern nur deren Verhältnis bestimmt werden konnte, was ein Anzeichen für effektives Diffusionsverhalten ist. Das zweikomponentige Reaktionsmodell, mit 5 Fitparametern (I_∞ als zusätzlicher freier Fitparameter), konnte die Daten schließlich, abgesehen von den ersten ca 2 s nach dem Bleichen, gut beschreiben (Daten nicht gezeigt).

FRAP-Messungen in strahleninduzierten Foci zeigten eine starke Verminderung der Mobilität, verglichen zu der in unbestrahlten Zellen (siehe Abbildung 3.32). Eine nur sehr langsame Zunahme der Fluoreszenz in den gebleichten Foci war zu beobachten. Selbst zu Zeiten später als 800 s überschritt das Signal nicht 80 % der ursprünglichen Intensität. Die FRAP Kurven in strahlungsinduzierten Foci zeigten sehr unterschiedliches Verhalten. Die Intensität in den durch Röntgen-, Ru-Ionen- und Fe-Ionenbestrahlung induzierten Foci stieg, verglichen zu der nach Au- und insbesondere Kr- und C-Ionenbestrahlung, initial deutlich schneller an. Eine Korrelation mit dem LET bestand hierbei allerdings nicht. Messungen in ionenbestrahlten Zellen außerhalb der Foci zeigten keine deutliche Veränderung der Proteinmobilität im Vergleich zu unbestrahlten Zellen.

Obwohl der Fit mit dem effektiven Diffusionsmodell für die Messungen der unbestrahlten Zellen, wie oben beschrieben, bis ca. 100 s nicht gut in die Daten passte, wurde das Ergebnis für

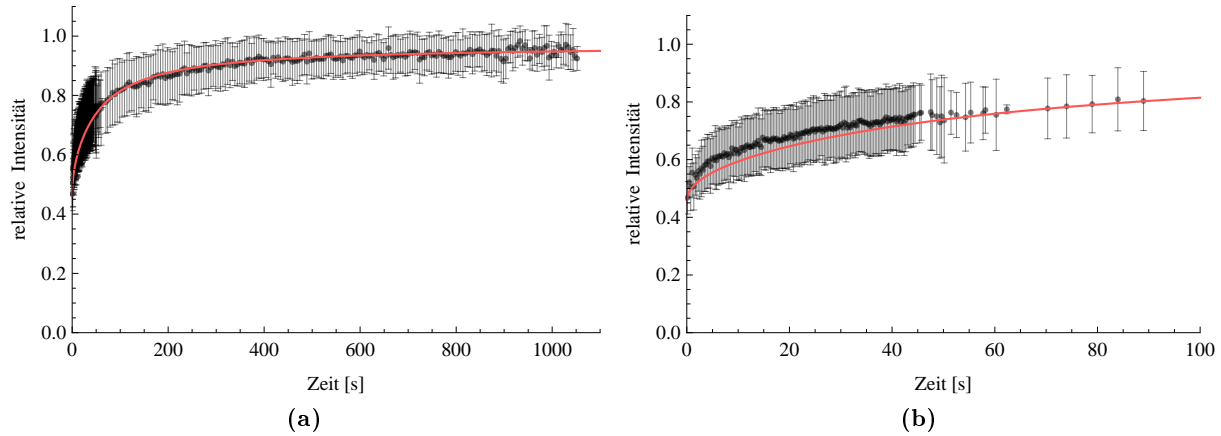


Abbildung 3.31: 53BP1-GFP Mobilität in unbestrahlten U2OS Zellen gefittet mit dem Diffusionsmodell. (a): Messung über den gesamten Zeitbereich von ca. 1050 s (b): Vergrößerter Ausschnitt aus (a) mit Darstellung bis 100 s. Fehlerbalken: Standardabweichung.

D_{1eff} verwendet, um die FRAP-Messungen in den strahleninduzierten Foci mit dem Diffusions-Reaktionsmodell zu fitten. Für den besseren Vergleich der Ergebnisse wurden die Messkurven einheitlich bis 600 s gefittet, und die deutlich kürzere Messung nach Ru-Ionenbestrahlung wurde nicht ausgewertet. Für die Proteinmasse wurde ein Wert von 244 kDa angenommen und der Zellkernradius wurde auf $10,2 \mu\text{m}$ bestimmt. Die resultierenden Fits sind in Abbildung 3.33 gezeigt. Bei allen Messungen sind bis ca. 100 s deutliche Abweichungen der Fits von den Messdaten zu erkennen. Danach passen sich die Fits in allen Fällen mit kleinen Abweichungen gut in die Daten ein. Die sich ergebenden Fitkonstanten sind in Tabelle 3.5 gelistet. $F_{eq,1eff}$ ergibt sich hierbei nach Formel 3.25 aus k_{2on} , k_{2off} und γ_{1eff} . Für alle drei bestimmten Parameter ist keine Korrelation mit der Schadensdichte, also dem LET, zu erkennen.

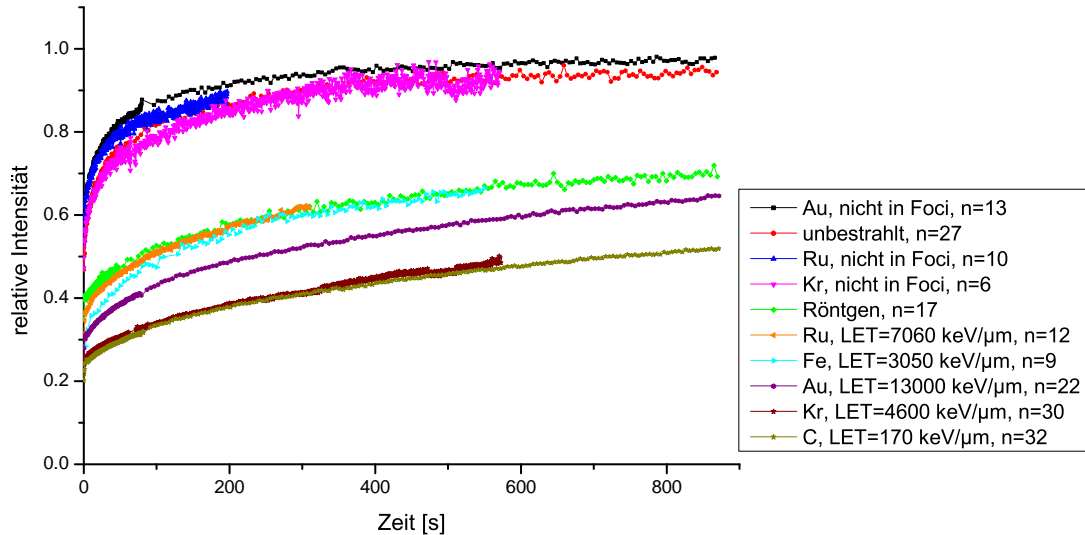


Abbildung 3.32: 53BP1-GFP Dynamik in U2OS Zellen nach DNA-Schadensinduktion mit Röntgen- und Ionenbestrahlung. Die Messung in unbestrahlten Zellen ist zum Vergleich gezeigt. "Nicht in Foci" beschreibt FRAP Messungen nach Ionenbestrahlung, aber nicht in Foci des Streifens, sondern außerhalb an einer beliebigen Stelle im Zellkern. Aus Gründen der Übersichtlichkeit, wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet. Diese sind in den Abbildungen 3.31 und 3.33 gezeigt.

Tabelle 3.5: Fitergebnisse aus Abbildung 3.33.

Bestrahlung	LET $\left[\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}\right]$	$k_{2\text{on}}^* \left[\frac{1}{\text{s}}\right]$	$k_{2\text{off}} \left[\frac{1}{\text{s}}\right]$	$F_{\text{eq,1eff}}$
Röntgen	1	$0,71 \pm 0,02$	$0,00091 \pm 0,00002$	$0,37 \pm 0,01$
C-Ionen	170	$0,95 \pm 0,01$	$0,000619 \pm 0,000007$	$0,232 \pm 0,004$
Fe-Ionen	3050	$0,82 \pm 0,05$	$0,0012 \pm 0,0001$	$0,40 \pm 0,03$
Kr-Ionen	4600	$1,31 \pm 0,02$	$0,00080 \pm 0,00001$	$0,22 \pm 0,01$
Au-Ionen	13000	$0,84 \pm 0,01$	$0,00086 \pm 0,00001$	$0,32 \pm 0,01$

Versuche, die Daten mit den vereinfachten Varianten des Diffusions-Reaktionsmodells zu beschreiben, führten in keinem Fall zu einem guten Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Durch den sehr langsamen und nicht sättigenden Anstieg der Kurven, erwies sich das Diffusionsmodell zum Fitten der Messdaten als völlig ungeeignet. Die Kurven wurden deswegen mit dem Reaktionsbasierten Modell mit einer Bindungskomponente gefittet (Daten nicht gezeigt). In allen Fällen wich der Fit deutlich von den ersten Datenpunkten ab, zu späteren Zeiten, nach ca. 200 s, passte er sich besser in die Daten ein. Die letzten Messpunkte der Kurven lagen in allen Fällen wieder deutlich über dem Fit. Somit konnte das 53BP1-Bindevverhalten in den Foci auch mit dem einkomponentigen Bindungsmodell nicht gut beschrieben werden.

Da die Schadensdichte offensichtlich nicht die unterschiedlichen Messergebnisse bewirkte, wurde der Vermutung nachgegangen, dass ein unterschiedliches Proteinexpressionslevel die Ursache sein könnte. Aus diesem Grund wurde die mittlere Fluoreszenzintensität im Fokus und im gesamten Kern der einzelnen Zellen bestimmt. Auf diese Weise wurde experimentell ermittelt, ob eine höhere Gesamtproteinmenge zu einer vermehrten Bindung in den Foci führt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.34 für Au-Ionen- und Röntgenbestrahlung gezeigt. Es ist eine deutliche lineare Korrelation zwischen der mittleren Fluoreszenzintensität des gesamten Zellkerns und der in den Foci zu erkennen.

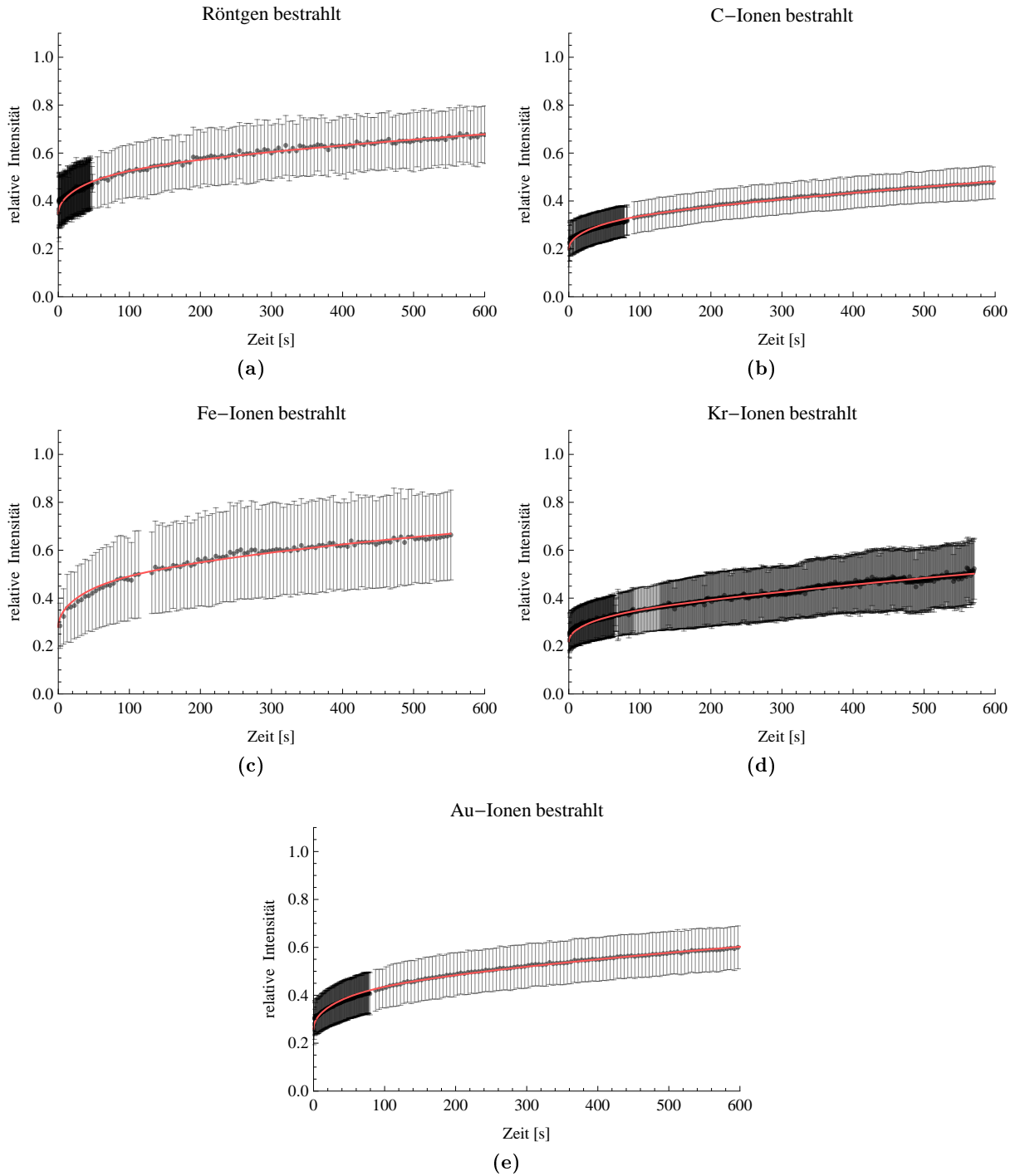


Abbildung 3.33: Fits der in Abbildung 3.32 gezeigten Messungen in Foci mit dem Diffusions-Reaktionsmodell. Fehlerbalken: Standardabweichung.

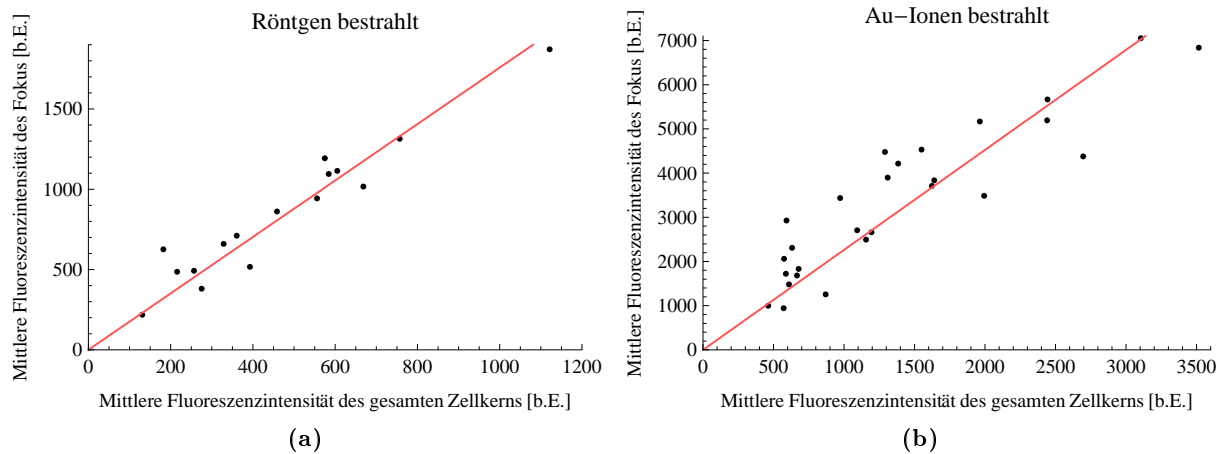


Abbildung 3.34: Korrelation zwischen der mittleren Fluoreszenzintensität im gesamten Zellkern und in den Foci, nach Röntgen (a) und nach Au-Ionenbestrahlung (b).

ATR

Auch für ATR wurde zunächst das dynamische Verhalten im Kernplasma von unbestrahlten Zellen untersucht. Die entsprechende FRAP-Messung ist in Abbildung 3.35 mit dem Diffusions-Fit dargestellt, der für einen Bleichpunktradius von $1,5 \mu\text{m}$ eine effektive Diffusionskonstante von $0,50 \pm 0,01 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ergibt und sich sehr gut in die Daten einpasst. Versuche, die Daten mit dem einkomponentigen Reaktionsbasierten Modells zu beschreiben, erbrachten keine guten Fitergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Messungen von ATR in strahleninduzierten Foci nach Cr- und Au-Ionenbestrahlung zeigten eine deutliche Reduktion der ATR-Mobilität (siehe Abbildung 3.35). Die Kurve nach Au-Ionenbestrahlung lag unter der nach Cr-Ionenbestrahlung. Messungen nach Röntgenbestrahlung waren nicht möglich, da diese Art der Bestrahlung keine deutlichen Foci induzierte (siehe auch Abschnitt 3.1.2). In Abbildung 3.35 sind für die zwei Messungen nach Ionenbestrahlung die Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell dargestellt. Hierfür wurde der Zellkernradius auf $10,0 \mu\text{m}$ bestimmt und eine Proteinmasse von 318 kDa angenommen. In keinem Fall passt sich der Fit gut in die Daten ein. Er verläuft zu frühen Zeiten immer über der Messkurve, bei mittleren Zeiten darunter und schließlich bei langen Zeiten wieder über den Messdaten. Auch wenn mit diesem Modell die Daten nach Schwerionenbestrahlung nicht genügend gut beschrieben werden konnten, sind die Fitergebnisse in Tabelle 3.6 zur Einschätzung der Größenordnung aufgeführt. Die in Abbildung 3.35 gezeigten Daten nach Ionenbestrahlung wurden auch mit dem Diffusionsmodell, dem Reaktionsmodell mit einem Bindungszustand und den vereinfachten Varianten des Diffusions-Reaktionsmodells gefittet. Allerdings wurden hierbei in keinem Fall gute Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt).

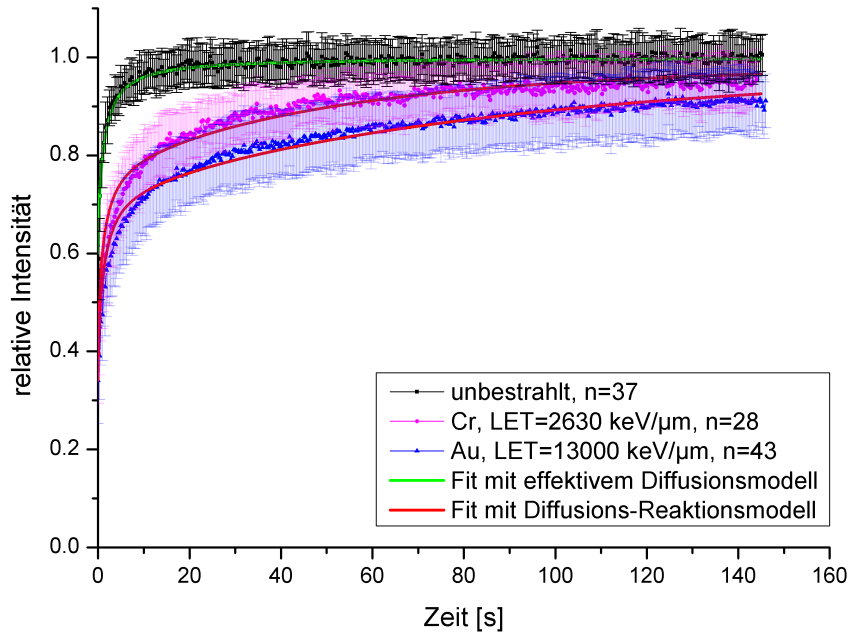


Abbildung 3.35: Dynamik von ATR-GFP in U2OS Zellen. FRAP-Messungen von ATR-GFP in unbestrahlten Zellen und in strahlungsinduzierten Foci nach Cr- und Au-Ionenbestrahlung. Die Messungen unbestrahlter Zellen sind mit dem effektiven Diffusionsmodell gefittet, die nach Ionenbestrahlung mit dem Diffusions-Reaktionsmodell. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Tabelle 3.6: Ergebnisse für k_{2on}^* und k_{2off} der in Abbildung 3.35 gezeigten Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell. $F_{eq,1eff}$ ist nach Formel 3.25 aus k_{2on}^* und k_{2off} bestimmt.

Bestrahlung	LET [$\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$]	k_{2on}^* [$\frac{1}{\text{s}}$]	k_{2off} [$\frac{1}{\text{s}}$]	$F_{eq,1eff}$
Cr-Ionen	2630	$0,088 \pm 0,004$	$0,0184 \pm 0,0005$	$0,69 \pm 0,01$
Au-Ionen	13000	$0,072 \pm 0,002$	$0,0111 \pm 0,0002$	$0,62 \pm 0,01$

Da der Fit des Diffusions-Reaktionsmodells zu kurzen Zeiten immer über den Daten verläuft, ist anzunehmen, dass mit einem verringerten D_{1eff} die Daten besser beschrieben werden könnten. Aus diesem Grund wurden die Daten erneut mit dem Diffusions-Reaktionsmodell gefittet, wobei D_{1eff} allerdings als freier Fitparameter mitbestimmt wurde. Die resultierenden Fits beschreiben die Daten sehr gut (siehe Abbildung 3.36). Wie an den Fitergebnissen in Tabelle 3.7 zu sehen, wurden auf diese Weise deutlich geringere Werte für D_{1eff} bestimmt.

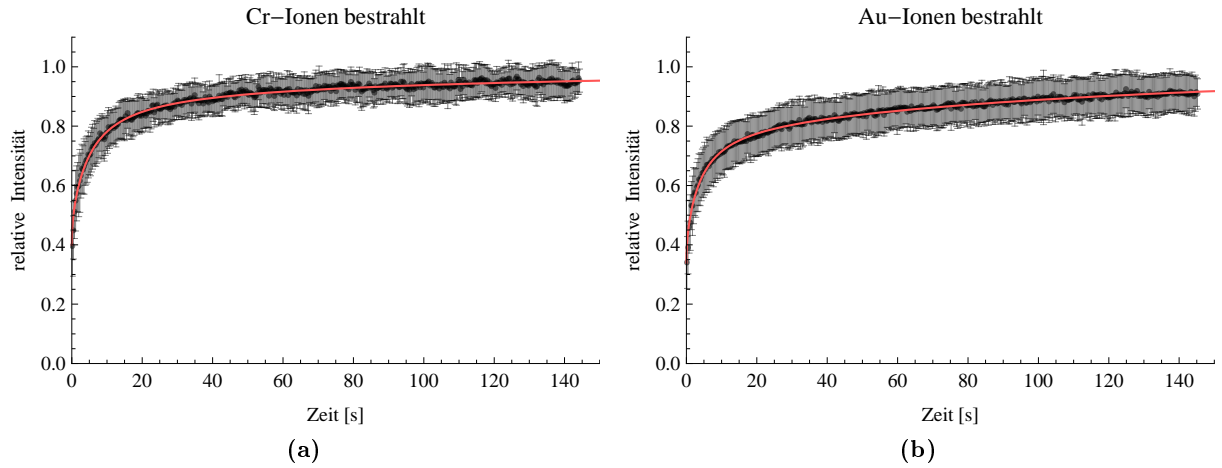


Abbildung 3.36: Ergebnisse mit dem Diffusions-Reaktionsmodell und D_{1eff} als zusätzlichen freien Fitparameter. (a): Nach Cr-Ionenbestrahlung (b): Nach Au-Ionenbestrahlung. Fehlerbalken: Standardabweichung.

Tabelle 3.7: Ergebnisse der in Abbildung 3.36 gezeigten Fits mit dem Diffusions-Reaktionsmodell und D_{1eff} als zusätzlichen freien Fitparameter.

Bestrahlung	LET $\left[\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}\right]$	D_{1eff} $\left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}\right]$	$k_{2on}^* \left[\frac{1}{\text{s}}\right]$	$k_{2off} \left[\frac{1}{\text{s}}\right]$	$F_{eq,1eff}$
Cr-Ionen	2630	$0,130 \pm 0,003$	$0,025 \pm 0,003$	$0,0058 \pm 0,0005$	$0,90 \pm 0,01$
Au-Ionen	13000	$0,163 \pm 0,004$	$0,078 \pm 0,002$	$0,0074 \pm 0,0001$	$0,76 \pm 0,01$

3.3 Etablierung eines Versuchsaufbaus zur Analyse von Proteininteraktionen mittels FRET-Mikroskopie

Um in zukünftigen Forschungsarbeiten Proteininteraktionen speziell am DNA-Schaden mit bildgebenden Methoden messen zu können, wurde hierfür ein Mikroskopaufbau entwickelt und validiert. Als Basis für den Aufbau diente ein konfokales Spinning-Disk Mikroskop, welches so modifiziert wurde, dass es zum einen FRET-Messungen ermöglicht, zum anderen aber auch weiterhin für Standardanwendungen der Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist. Im ersten Schritt wurde eine der verschiedenen FRET-Messmethoden ausgewählt.

3.3.1 Wahl der FRET-Messmethode

Die Prinzipien der Proteininteraktionsmessungen mittels FRET, sowie die verschiedenen Methoden zur Detektion dieser Prozesse und deren Vor- und Nachteile wurden bereits in den Abschnitten 1.4.1 und 1.4.2 vorgestellt. Da die Technik der Fluoreszenzlebenszeitmessung (1) schlichtweg den finanziellen Rahmen sprengte, spektrale Aufnahmen (2) für schnelle Lebendzellmessungen nicht die gewünschte zeitliche Auflösung ermöglichen und das Bleichen des Akzeptors (3) ein nicht reversibles und nicht repetitives Experiment darstellt, schieden diese Methoden von vornherein aus. Somit standen nur noch die Methoden des 2-Farbenverhältnisses und der Polarisationsanisotropie zur Wahl. Die 2-Farbenverhältnismethode setzt vergleichsweise aufwendige und auch fehleranfällige Normierungsrechnungen für die Donor- und Akzeptorkonzentration voraus. Da dies bei der Polarisationsanisotropie-Methode nicht nötig ist und dieses Verfahren somit robuster gegenüber Fehlinterpretationen vermeintlich positiver Ergebnisse ist, wurde diese Methode gewählt.

3.3.2 Planung und Aufbau eines polarisationsanisotropiebasierten FRET Messplatzes

Ein bereits vorhandener Aufbau, schematisch dargestellt in Abbildung 3.37, bestehend aus folgenden Komponenten stand zum Aufbau des polarisationsanisotropiebasierten FRET Messplatzes zur Verfügung:

- Nikon (Düsseldorf, Deutschland) TiE Mikroskop mit Intensilight, 60x und 100x NA Plan-Apo Objektiven (genaue Objektspezifikationen siehe unten)
- Yokogawa (Tokyo, Japan) CSU-X1 M2L-E Spinning Disk für die Konfokalität des Systems
- Sutter Instruments (Novato, USA) Lambda 10-B/Smart Filterrad im Emissionsstrahlengang
- Pecon (Erbach, Deutschland) Klimakammer und CO₂-Begasungskammer
- Andor (Belfast, Irland) EM-CCD Kamera X-3884-DU-885K-CS0
- Andor Breakout Box
- Andor Laser Combiner mit 405 nm, 488 nm, 561 nm und 647 nm Lasern und einem AOTF (*Acousto-optic tunable filter*)
- Prior (Jena, Deutschland) Piezo-stage NanoscanZ
- Steuerung der Komponenten über die AndorIQ Software Version 1.10.2
- Prior ProScanII motorisierter Probentisch

- Newport (Irvine, USA) RS2000 mit Druckluft schwingungsgedämpfter Tisch

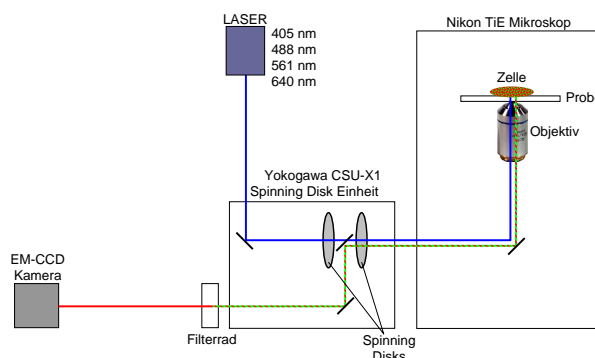


Abbildung 3.37: Schematische Darstellung des Mikroskops vor der FRET-Erweiterung.

Um diesen Aufbau für Polarisationsanisotropie-Messungen verwenden zu können waren im Wesentlichen zwei Voraussetzungen zu erfüllen: (1) Das Anregungslicht musste linear polarisiert auf die Probe treffen und (2) die Polarisation des Fluoreszenzemissionslichts von der Probe musste messbar sein. Hieraus ergaben sich die nötigen Modifikationen, welche im Folgenden vorgestellt werden.

Linear Polarisieren des Anregungslichts

Für die Polarisierung des Anregungslichts war es nötig an einer geeigneten Stelle im Anregungsstrahlengang einen Polarisator anzubringen.

Bei ersten Versuchen zeigte sich, dass die Polarisation des Lasers in der Spinning-Disk-Einheit verloren geht. Somit war es nicht möglich den Polarisator im Strahlengang vor der Spinning-Disk-Einheit zu montieren. Eine Montage dahinter war auch nicht möglich, da dort die Anregung und die Emission bereits identische Strahlengänge haben. Die optimale Position war somit direkt vor dem dichroitischen Spiegel im Anregungsstrahlengang, zwischen den beiden Spinning-Disks. Da an dieser Position allerdings nicht genügend Platz zur Verfügung stand und der Polarisator an dieser Stelle die Fokussierung des Lichts von der ersten Spinning-Disk auf die zweite beeinflussen würde, musste der Polarisator im Anregungsstrahlengang vor der ersten Spinning Disk montiert werden. Es zeigte sich, dass der dichroitische Spiegel auf einem Schlitten mit mehreren Positionen montiert war (siehe Abb. 3.38a). Um das Mikroskop auch weiterhin ohne polarisierte Anregung nutzen zu können, wurde ein zweiter dichroitischer Spiegel zusammen mit dem Polarisator an einer anderen Position des Schlittens montiert. Da für die hier geplanten FRET Anwendungen nur Anregungen mit 405 nm, 488 nm und 561 nm nötig waren, wurde statt des schon montierten 4-Farben dichroitischen Spiegels hier ein 3-Farben Spiegel zusammen mit dem Polarisator gewählt. Dieser Spiegel reflektiert mehr Fluoreszenzlicht und führt im entsprechenden Wellenlängenbereich zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal. Die genauen Bezeichnungen und spektralen Eigenschaften der Spiegel sind im Anhang in Abbildung A.1 und A.2 gezeigt. Aus Platzgründen konnte nur ein relativ dünner Polarisator gewählt werden, der jedoch für einen Wellenlängenbereich von 405 nm bis 561 nm gute Transmissionseigenschaften aufweisen sollte. Aus diesen Gründen wurde ein Folienpolarisator aus dichroitischem Plastikmaterial gewählt. Hierbei handelt es sich um die unmontierte Variante des 069-1105 Polarisators von Optosigma (Santa Ana, USA), bei der auf die Glasabdeckungen des dichroitischen Materials verzichtet wurde, wodurch der Polarisator deutlich dünner ist. Das Extinktionsverhältnis dieses Polarisators beträgt $1 \cdot 10^{-4}$.

Ein detailliertes Transmissionsspektrum ist ebenfalls im Anhang in Abbildung A.3 gezeigt. Dieser Polarisator wurde in einer speziell angefertigten Halterung vor dem dichroitischen Spiegel angebracht, so dass sich bei fertiger Montage der Polarisator vor der ersten Spinning Disk im Anregungsstrahlengang und der dichroitische Spiegel zwischen den beiden Disks befindet (siehe Abb. 3.38a und 3.38b). Der Schlitten wurde so modifiziert, dass er auf die beiden Positionen, mit bzw. ohne Polarisator, verschoben werden konnte. Hierfür wurden zwei Anschläge angebracht, ein Schieber am Schlitten montiert, und dieser nach außen durch ein Loch in der Spinning-Disk-Einheit geführt.

Durch einfaches Verschieben des Schlittens konnte nun der Polarisator in den Strahlengang rein gefahren und somit linear polarisiertes Anregungslicht erzeugt werden.

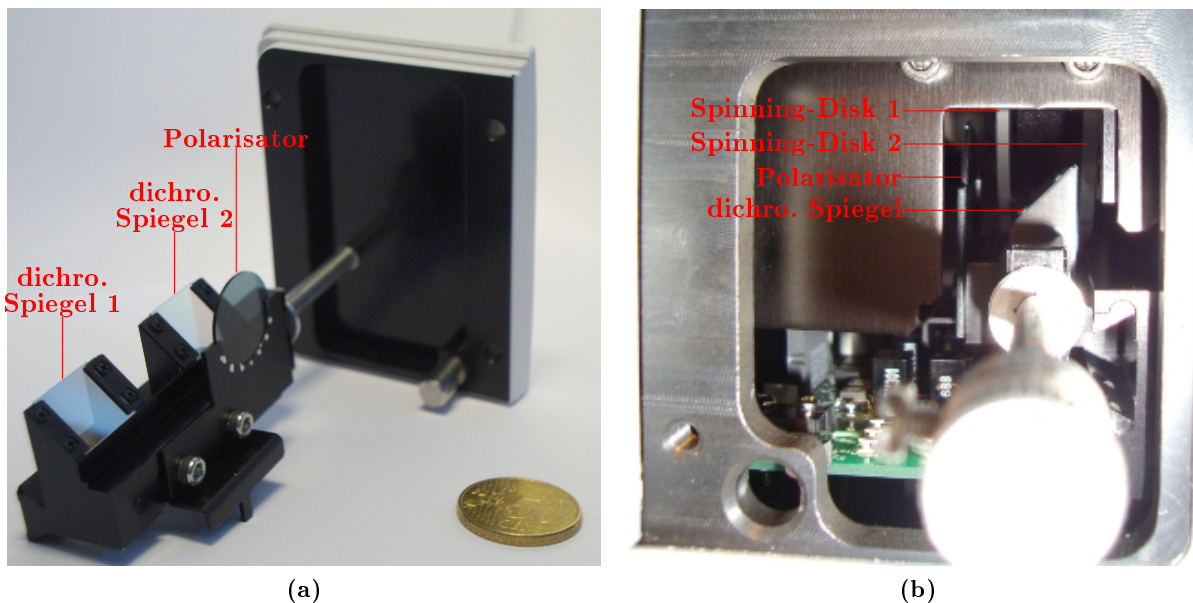


Abbildung 3.38: Anbringen des Polarisators in der konfokalen Spinning-Disk-Einheit. (a): Dichroitische Spiegel und Polarisator montiert auf dem Schlitten. Dichroitischer Spiegel 1 bezeichnet den 4-Farben Spiegel zur konventionellen Fluoreszenzaufnahme. Dichroitischer Spiegel 2 bezeichnet den 3-Farben Spiegel, vor dem für die FRET Messungen der Polarisator montiert wurde. (b): Position des Schlittens zwischen den zwei Spinning-Disks. Das Anregungslicht kommt von links, durchdringt den Polarisator, die erste Spinning-Disk, den dichroitischen Spiegel und die zweite Spinning-Disk.

Auftrennen des Emissionslichts in s- und p-Polarisation

Um die beiden Polarisationsrichtungen des Emissionslichts getrennt detektieren zu können, war eine Modifikation nötig, wodurch das Emissionslicht in s- und p-Polarisation aufgespalten wird. Hierzu wurde im Strahlengang nach dem Filterrad und dem optischen Tubus ein Polarisationsstrahlteiler eingebaut (siehe Abb. 3.39). Hierbei handelt es sich um das Produkt PBS201 von Thorlabs (Dachau/München, Deutschland). Die genauen Spezifikationen hierzu sind im Anhang in Abbildung A.4 aufgeführt. Der Strahlteiler wurde auf einer Schwenkvorrichtung montiert, die Drehungen in alle drei Raumrichtungen ermöglicht. Damit war eine exakte Ausrichtung des Strahlteilers und der Abgleich beider Bilder möglich. Diese Schwenkvorrichtung wurde wiederum auf einem Lineartisch montiert, um den Polarisationsstrahlteiler je nach Experimentbedarf in den Strahlengang ein- und ausfahren zu können. Eine angebrachte Messuhr ermöglichte die exakte Repositionierung. Die beiden getrennten s- und p-polarisierten Strahlen wurden durch

je eine Tubuslinse auf die schon vorhandene und auf eine neu montierte EM-CCD-Kamera des Typs DV887ECS-BV von Andor gelenkt. Zum Abgleich der beiden Bilder wurde außerdem eine der beiden Kameras in einer höhenverstellbaren, die andere in einer schwenkbaren Vorrichtung montiert. Eine Kamera hat eine Pixelgröße von $8\ \mu\text{m} \times 8\ \mu\text{m}$, die andere eine von $16\ \mu\text{m} \times 16\ \mu\text{m}$. Deshalb musste mit einer Binningeinstellung von 2×2 für die erstere gearbeitet werden, damit sich die Bilder der beiden Kameras exakt überlagern lassen. Der Aufbau mit Strahlteiler, den optischen Tuben und den beiden Kameras ist in Abbildung 3.39 gezeigt. Der komplette, auf einem Druckluft gedämpften Tisch montierte Aufbau, ist in Abbildung 3.40 zu sehen.

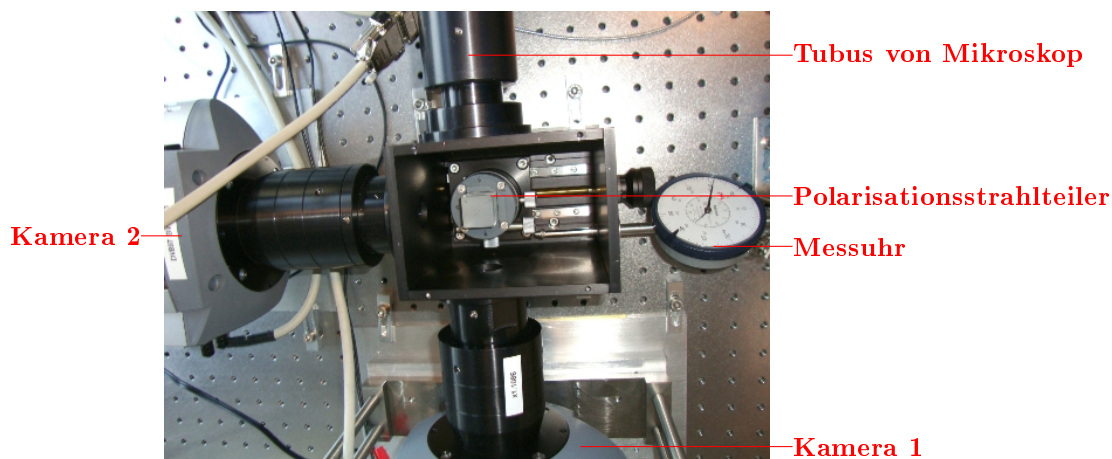


Abbildung 3.39: Polarisationsstrahlteiler im Emissionsstrahlengang in Aufsicht dargestellt. Das vom Mikroskop kommende Emissionslicht wird am Polarisationsstrahlteiler auf die beiden EM-CCD Kameras aufgeteilt. Der Polarisationsstrahlteiler kann nach rechts aus dem Strahlengang gefahren werden. Die Messuhr ermöglicht die exakte Repositionierung.

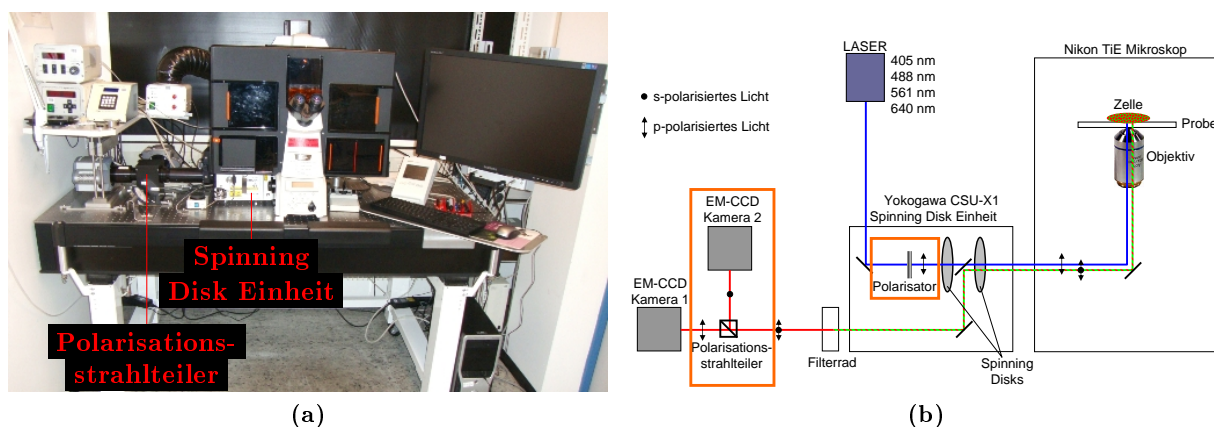


Abbildung 3.40: Kompletter experimenteller Aufbau für polarisationsanisotropiebasierte FRET-Messungen. (a): Foto des Aufbaus. Die Position der Spinning Disk Einheit und des Polarisationsstrahlteilers sind markiert (vergleiche Abbildung 3.38 und 3.39). (b): Schematische Darstellung des Aufbaus. Die Modifikationen sind orange umrandet (vergleiche Abbildung 3.37).

Synchronisation der Bildaufnahme

Um ein synchrones Aufnehmen der beiden Kameras zu gewährleisten, wurde eine Kamera als "master" und eine als "slave" betrieben. Die Software AndorIQ wurde zweimal auf dem Computer gestartet, einmal mit der master Kamera und allen eingebundenen Komponenten, wie Laser, AOTF, Filterrad etc., und einmal mit lediglich der Slave Kamera. Für beide Kameras wurde ein Modus gewählt, der die Bildaufnahme durch einen externen TTL-Trigger Puls startet. Bei Serienaufnahmen musste deshalb die Bildanzahl beider Kameras gleich und die Summe der Belichtungs- und Auslesezeit der "slave"-Kamera kleiner gleich der der "master"-Kamera gewählt werden.

Wahl der geeigneten Fluoreszenzfilter

Meist wird FRET zwischen zwei verschiedenen Farbstoffen gemessen. Eine Vielzahl von Kombinationen ist hierbei möglich. Der hier beschriebene Aufbau sollte für blau-/gelb- und grün-/rot- fluoreszierende Farbstoffe geeignet sein. In späteren Versuchen (siehe Abschnitt 3.4) wurden die entsprechend fluoreszierenden Farbstoffe mit den Bezeichnungen Cerulean/Venus und GFP/mCherry verwendet. Hierfür mussten zunächst die richtigen Fluoreszenzfilter gewählt werden. Die genauen Bezeichnungen der gewählten Filter und deren spektrale Eigenschaften sind im Anhang in den Abbildungen A.5 bis A.8 aufgeführt.

Nachdem diese Voraussetzungen geschaffen wurden, konnte das System in den nächsten Schritten auf seine Anwendbarkeit geprüft werden.

3.3.3 Charakterisierung des polarisationsanisotropiebasierten FRET Messplatzes

Bei der Charakterisierung des polarisationsanisotropiebasierten FRET-Messplatzes musste im Wesentlichen der Erhalt der linearen Polarisation im Anregungs- und Emissionsstrahlengang getestet werden. Hierfür wurden alle nicht benötigten optischen Komponenten im Mikroskop, wie z.B. das Wollaston Prisma, das für DIC-Mikroskopie (Differentialinterferenzkontrast) direkt unter dem Objektiv montiert ist, entfernt.

Alle folgenden Messungen der Polarisation wurden mit einem Polarisator durchgeführt, der die gleichen Spezifikationen wie der Polarisator im Anregungsstrahlengang besitzt. Hierbei handelt es sich um die montierte Variante mit Glasabdeckungen. Das Extinktionsverhältnis beträgt somit ebenfalls 10^{-4} . Die wellenlängenabhängigen Transmissionseigenschaften sind im Anhang in Abbildung A.3 gezeigt. Die in diesem Abschnitt gezeigten Messungen wurden mit folgender Funktion gefittet, wobei die Transmission T einer eben polarisierten Welle durch einen Polarisator gegeben ist durch (Bass et al., 1995):

$$T = (T_1 - T_2) \cos^2(\theta + s) + T_2 \quad (3.27)$$

T_1 beschreibt die Transmission bei paralleler Ausrichtung der einfallenden Welle und des Polarisators, T_2 beschreibt die Transmission bei senkrechter Ausrichtung. θ ist der Winkel zwischen der Ausrichtung der einfallenden Welle und des Polarisators. $-s$ bezeichnet die Lage des Maximums.

Erhalt der Polarisation im Anregungsstrahlengang

Zunächst wurde der Polarisationserhalt im Anregungsstrahlengang gemessen. Hierzu wurde der Polarisator wie oben beschrieben in die Spinning-Disk-Einheit eingebaut. Die Laserintensität wurde an der Position der Probe mit einem Lasermessgerät, vor dem der rotierbare Analysator montiert war, gemessen. Da Objektive mit hohen numerischen Aperturen die Polarisation beeinflussen können, wurden diese Messungen ohne Objektiv durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.41 gezeigt.

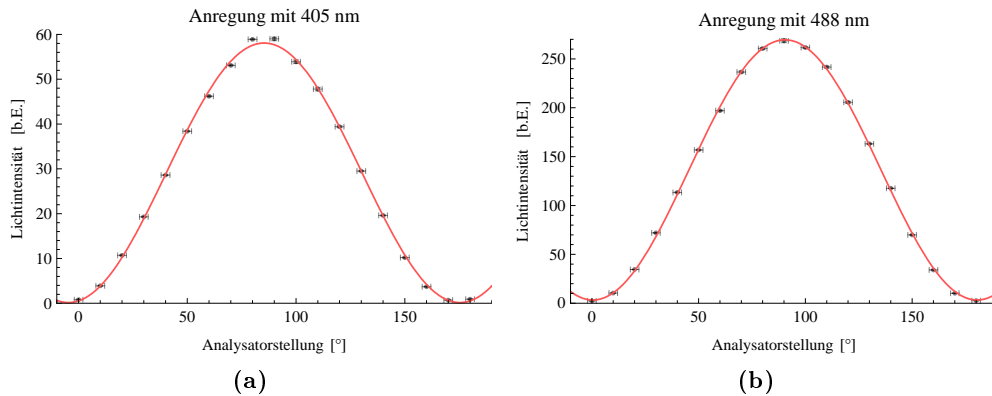


Abbildung 3.41: Polarisation des Laseranregungslichts. Die Messungen wurden an der Position der Probe und ohne Objektiv gemessen. Dargestellter Fit nach Formel 3.27. (a): bei 405 nm Anregung. Fitergebnis: $T_1=58,18$; $T_2=0,15$; $s=-85,4^\circ$ (b): bei 488 nm Anregung. Fitergebnis: $T_1=269,5$; $T_2=3,3$; $s=-90,5^\circ$

Erhalt der Polarisation im Emissionsstrahlengang

Als nächstes wurden die Polarisations Eigenschaften im Emissionsstrahlengang untersucht. Auch diese Messungen wurden ohne Objektiv durchgeführt. Als Lichtquelle wurde das unpolarisierte Durchlicht des Mikroskops verwendet. Ein rotierbarer Polarisator wurde auf dem Probenstisch angebracht. Die Lichtintensität wurde nach dem Polarisationsstrahlteiler auf beiden Kameras gemessen, und die Messergebnisse mit Gleichung 3.27 gefittet (siehe Abbildung 3.42).

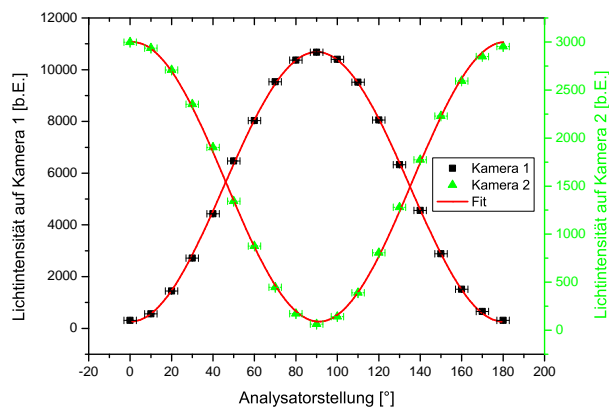


Abbildung 3.42: Polarisation der Emission. Mit der Durchlichtvorrichtung des Mikroskops als Lichtquelle und einem auf dem Probenstisch montierten Polarisator, wurde die Lichtintensität auf Kamera 1 und 2 nach dem Polarisationsstrahlteiler gemessen. Die Messungen wurden ohne Objektiv durchgeführt. Fits nach Formel 3.27. Fitergebnis Kamera 1: $T_1=10685$; $T_2=260$; $s=-90,1^\circ$, Fitergebnis Kamera 2: $T_1=3000$; $T_2=90$; $s=-1,1^\circ$

3.3.4 Bestimmung der Polarisationsanisotropie und des G-Faktors

Die Polarisationsanisotropie r wird, gemäß Formel 1.16, folgendermaßen berechnet:

$$r = \frac{I(Kam1) - G \cdot I(Kam2)}{I(Kam1) + 2 \cdot G \cdot I(Kam2)} \quad (3.28)$$

$I(Kam1)$ und $I(Kam2)$ sind die Lichtintensitäten, die auf Kamera 1 bzw. 2 gemessen wurden. G ist ein aufbau- und einstellungsspezifischer Faktor. Er wird zum einen durch unterschiedliche Transmissionseigenschaften des Aufbaus für die beiden Polarisationsrichtungen und zum anderen durch Sensitivitätsunterschiede beider Kameras bedingt. Um den G -Faktor zu bestimmen, wurde unpolarisiertes Durchlicht verschiedener Intensitäten mit den exakten Einstellungen des Experiments auf beiden Kameras gemessen. Trägt man die Intensitäten gegeneinander auf, so erhält man aus der Steigung der Geraden den Sensitivitätsunterschied für die Detektion der beiden Polarisationsrichtungen. Dies ist in Abbildung 3.43 exemplarisch gezeigt. Der G -Faktor ist in diesem Beispiel $1/0,55=1,82$. Somit ist die Sensitivität der mit Kamera 2 detektierten Polarisationsrichtung um den Faktor 1,82 geringer als die mit Kamera 1 gemessene Polarisationskomponente.

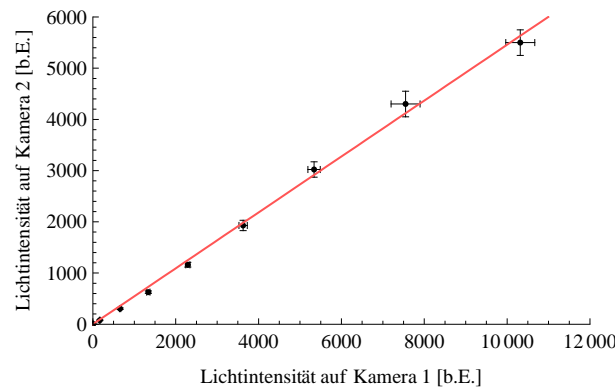


Abbildung 3.43: G-Faktor Bestimmung. Unpolarisiertes Durchlicht wurde nach dem Polarisationsstrahlteiler mit beiden Kameras gemessen. Die Steigung der Geraden beträgt 0,55.

Da sich der G -Faktor, wie bereits erwähnt, durch die Transmissionsunterschiede für beide Polarisationsrichtungen im Aufbau und durch die Sensitivitätsunterschiede der Kameras bestimmt wird, sollten die jeweiligen Beiträge näher untersucht werden. Hierfür wurde unpolarisiertes Durchlicht mit einem Polarisator auf dem Probentisch linear polarisiert, und ohne Verwendung des Polarisationsstrahlteilers nur mit Kamera 1 gemessen. Diese Messungen wurden mit dem 3-Farben dichroitischen Spiegel, der für alle Polarisationsmessungen verwendet wurde, aber auch mit dem 4-Farben dichroitischen Spiegel durchgeführt. Die Messungen sind in Abbildung 3.44 gezeigt.

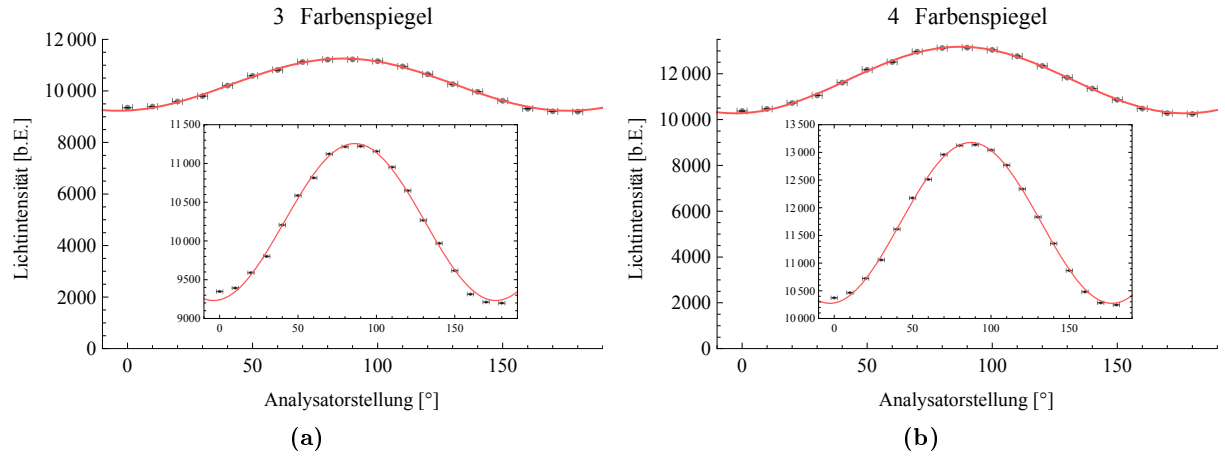


Abbildung 3.44: Abhängigkeit der Transmission im Emissionsstrahlengang von der Polarisationsausrichtung. Mit einem, auf dem Probenstisch montierten Polarisator, wurde das Durchlicht polarisiert. Die Lichtintensität auf Kamera 1, ohne Verwendung des Polarisationsstrahlteilers, ist gezeigt. Die Messungen wurden ohne Objektiv durchgeführt. Die Messungen wurden mit Formel 3.27 gefittet. Die Zusatzabbildung zeigt den gleichen Graphen mit jeweils vergrößertem y-Achsenabschnitt. (a): Bei Verwendung des 3-Farbenspiegels. Fitergebnis: $T_1=11256$; $T_2=9232$; $s=-86,2^\circ$ (b): Bei Verwendung des 4-Farbenspiegels. Fitergebnis: $T_1=13178$; $T_2=10274$; $s=-87,2^\circ$

3.4 FRET-Lebendzellmessungen mit Referenzstandards

Die Funktionalität des FRET Aufbaus wurde mit speziellen Referenzstandards untersucht. Hierfür standen Konstrukte in den Farbkombinationen blau/gelb und grün/rot zur Verfügung. In den folgenden Abschnitten 3.4.1 und 3.4.2 sind die Ergebnisse hierzu dargestellt.

3.4.1 FRET zwischen blau und gelb fluoreszierenden Proteinen in lebenden Zellen

Hier wurden die blau bzw. gelb fluoreszierenden Proteine mit den Bezeichnungen Cerulean bzw. Venus, beides Varianten des grün fluoreszierenden Proteins GFP, und die Konstrukte C5V und C5A verwendet. In dem C5V genannten Konstrukt ist Cerulean mit Venus über fünf Aminosäuren direkt verbunden (Koushik et al., 2006). Damit sind die beiden Chromophore räumlich sehr nahe und FRET wird möglich. C5A bezeichnet ein Konstrukt, in dem Cerulean über fünf Aminosäuren mit Amber, einer nicht fluoreszierenden Variante von Venus, verbunden ist.

Zunächst mussten in fünf verschiedenen Ansätzen Cerulean, Venus, C5V, C5A oder Cerulean zusammen mit Venus erfolgreich in U2OS Zellen transfiziert werden. Als Transfektionsreagenzien wurden hierfür Jetprime und Lipofectamine verwendet. Die genauen Protokolle sind im Abschnitt 2.1.3 beschrieben. Die Transfektion mit Lipofectamine erwies sich in allen Fällen als geeignet. Ein sehr großer Anteil der Zellen hatte das Plasmid aufgenommen und die Zellen machten morphologisch einen gesunden Eindruck. Ein anderes Bild zeigte sich nach der Jetprime Transfektion. Die Transfektionseffizienz für Cerulean und Venus war zwar etwas besser als mit Lipofectamine, jedoch konnten mittels dieser Methode nur sehr wenige Zellen mit C5V und C5A transfiziert werden. Aufgrund dessen wurden alle folgenden Experimente mit einer Lipofectamine Transfektion durchgeführt.

Nach der erfolgreichen Transfektion der Konstrukte in Zellen, wurden Fluoreszenzaufnahmen gemacht. Hierbei wurden zum einen die Polarisationsanisotropie mittels der beiden Kameras und zum anderen die gesamte Fluoreszenzintensität gemessen. Letzteres entspricht der Summe beider gemessener Kamerasignale. Eine typische Messung ist in Abbildung 3.45 dargestellt. Die Zellen wurden entweder mit Cerulean, Venus, C5V, C5A oder gleichzeitig mit Cerulean und Venus transfiziert. Die Polarisationsanisotropie und die Fluoreszenz wurden jeweils für polarisierte 405 nm und 488 nm Laseranregung, sowie für gelbe und blaue Emission mit entsprechenden Emissionsfiltern gemessen. Die spektralen Eigenschaften der verwendeten Filter sind im Anhang in Abbildung A.5 dargestellt. Wie man in den Fluoreszenzaufnahmen bei 405 nm bzw. 488 nm Anregung und blauer bzw. gelber Emission sehen kann (letzten beiden Spalten von Abbildung 3.45), weist Cerulean und C5A nur blaue und Venus nur gelbe Fluoreszenz auf. Bei Doppeltransfektion mit Cerulean und Venus, sowie bei C5V Transfektion fluoreszieren die Zellen in gelb und in blau. In allen Fällen ist eine gelbe Fluoreszenz bei 405 nm Anregung zu sehen (vierte Spalte von Abbildung 3.45). Die von Venus ist jedoch sehr schwach, sodass sie kaum zu erkennen ist. Das Signal von C5V ist deutlich stärker als das der anderen. Durch die polarisierte Anregung und die selektive Detektion der beiden Polarisationsrichtungen konnte die Polarisationsanisotropie der Fluoreszenz bestimmt werden. Dies ist in den drei ersten Spalten von Abbildung 3.45 gezeigt. In den Fällen von Cerulean und C5A, die, wie bereits erwähnt, bei 488 nm Anregung keine gelbe Emission zeigten, konnte die entsprechende Polarisationsanisotropie nicht bestimmt werden. Für Venus, das bei 405 nm Anregung keine blaue und auch fast keine gelbe Emission zeigt, konnte

nur für die gelbe Emission in stark vereinzeltten Bereichen die Anisotropie bestimmt werden. In nahezu allen Fällen zeigt die Polarisationsanisotropie Werte von $0,33 \pm 0,04$. Dies ist in der unten dargestellten Farbtabelle in der Abbildung 3.45 für die Polarisationsanisotropie abzulesen. In drei Fällen aber ist die Polarisationsanisotropie verringert. Sie beträgt bei Doppeltransfektion von Cerulean und Venus mit 405 nm Anregung und gelber Emission $0,27 \pm 0,04$, bei C5V mit 488 nm Anregung und gelber Emission $0,23 \pm 0,02$ und bei C5V mit 405 nm Anregung und gelber Emission $0,06 \pm 0,02$. Alle angegebenen Fehler sind Standardabweichungen.

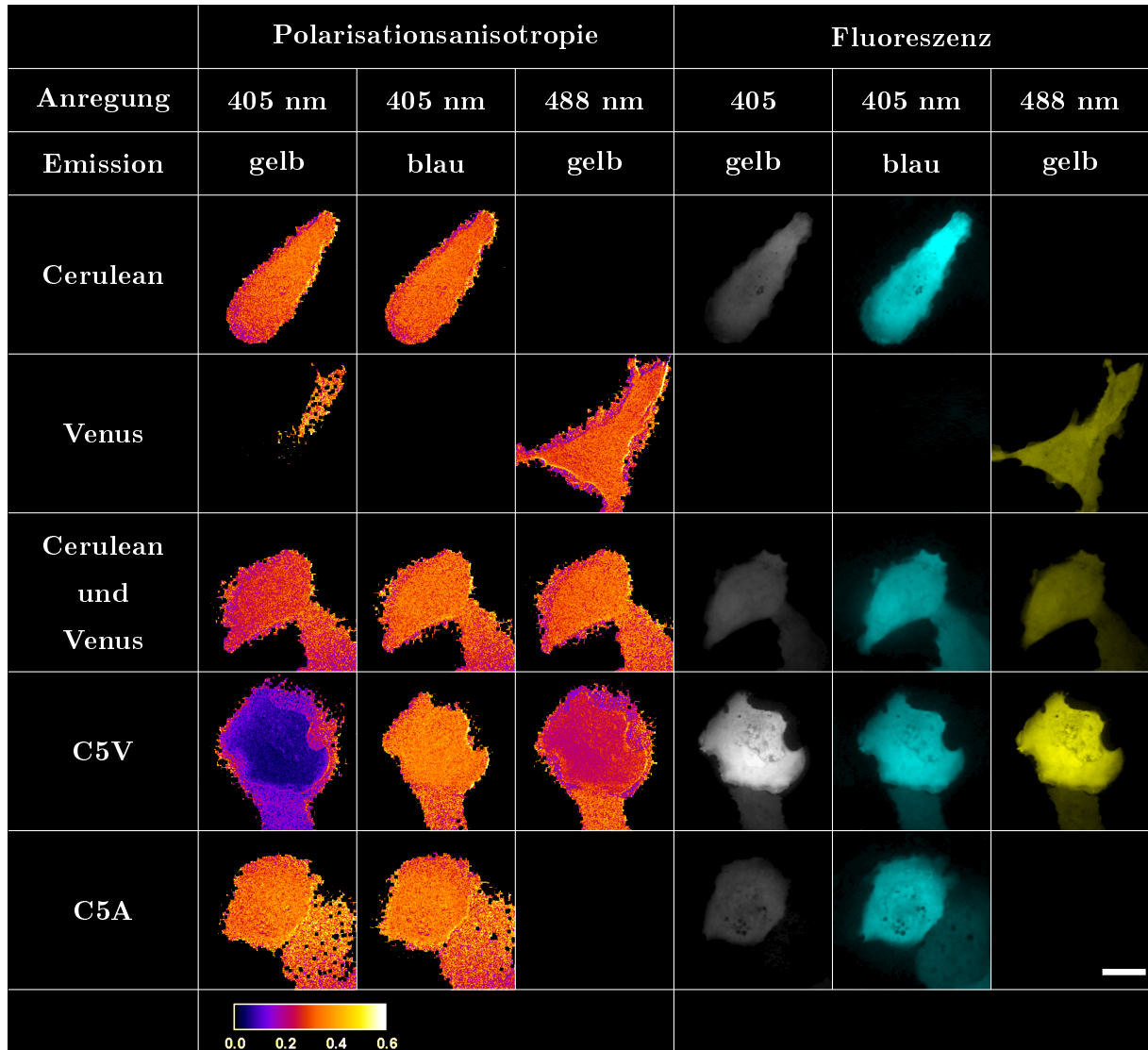


Abbildung 3.45: Messungen der Fluoreszenz und deren Polarisationsanisotropie von blau/gelben FRET-Konstrukten in U2OS Zellen. U2OS Zellen wurden mit Cerulean, Venus, C5V, C5A oder gleichzeitig mit Cerulean und Venus transfiziert. Cerulean ist ein blau und Venus ein gelb fluoreszierendes Protein. C5V und C5A beschreiben zwei verschiedene Konstrukte, in dem Cerulean über 5 Aminosäuren mit Venus bzw. mit Amber gekoppelt ist. Amber ist eine nicht fluoreszierende Variante von Venus. Der Maßstab beträgt $20 \mu\text{m}$. Die Polarisationsanisotropie ist in der unten aufgeführten Farbskala dargestellt. Die G-Faktoren sind für die Polarisationsanisotropie in den Spalten von links nach rechts: 2,06; 2,21; und 2,08. Zur besseren Darstellung des gesamten Intensitätsbereichs sind die Fluoreszenzaufnahmen mit einer Gammakorrektur von 0,55 dargestellt.

3.4.2 FRET zwischen grün und rot fluoreszierenden Proteinen in lebenden Zellen

Ähnlich zu den in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen Versuchen, wurden auch Experimente mit grün/roten Konstrukten durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen entweder mit GFP, mCherry, gleichzeitig mit GFP und mCherry, oder mit pByffu transfiziert. GFP ist ein grün fluoreszierendes Protein, mCherry fluoresziert rot und pByffu ist ein Konstrukt in dem GFP und mCherry über 13 Aminosäuren miteinander verbunden und so in räumliche Nähe gebracht wurden (Tramier et al., 2006). Es wurden U2OS Zellen verwendet. Beide Transfektionsreagenzien Jetprime und Lipofectamine erwiesen sich für diese Konstrukte als geeignet. In beiden Fällen erschienen die Zellen morphologisch gesund, jedoch war dieser Eindruck bei Jetprime noch etwas besser, weshalb für weitere Experimente nur mit Jetprime transfiziert wurde.

Das Fluoreszenzsignal und dessen Polarisationsanisotropie für eine repräsentative Messung sind in Abbildung 3.46 gezeigt.

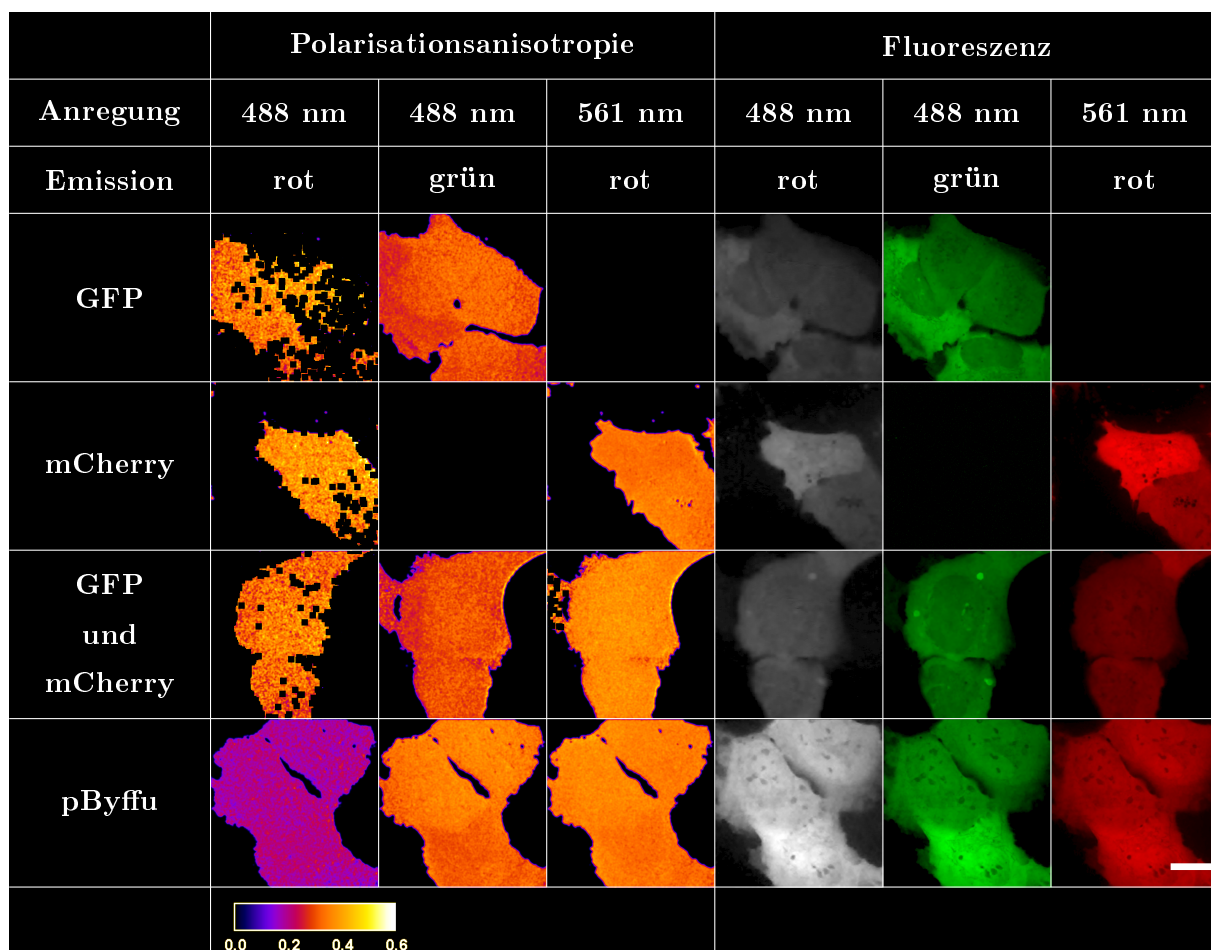


Abbildung 3.46: Messungen der Fluoreszenz und deren Polarisationsanisotropie von grün/roten FRET-Konstrukten in U2OS Zellen. GFP ist ein grün und mCherry ein rot fluoreszierendes Protein. pByffu bezeichnet ein Konstrukt, in dem GFP und mCherry über 13 Aminosäuren miteinander verbunden sind. Der Maßstab beträgt 20 μm . Die G-Faktoren sind für die Polarisationsanisotropie in den Spalten von links nach rechts: 2,04; 1,83 und 2,06. Zur besseren Darstellung des gesamten Intensitätsbereichs sind die Fluoreszenzaufnahmen mit einer Gammakorrektur von 0,55 dargestellt.

Wie in den letzten beiden Spalten der Abbildung ersichtlich, zeigt mCherry keine grüne und GFP keine rote Fluoreszenz bei 488 nm bzw. 561 nm Anregung. Bei 488 nm Anregung zeigen alle Konstrukte eine rote Fluoreszenzemission, wobei die von pByffu am intensivsten ist. Die Polarisationsanisotropie ist in den Fällen, in denen keine Fluoreszenz detektiert werden kann, also für GFP bei 561 nm Anregung und roter Emission und bei mCherry bei 488 nm Anregung und grüner Emission, nicht messbar. In fast allen anderen Fällen beträgt die Polarisationsanisotropie $0,34 \pm 0,02$. Für pByffu wurde jedoch eine deutlich verminderte Polarisationsanisotropie bei 488 nm Anregung und roter Emission von $0,19 \pm 0,02$ gemessen. Die Werte von GFP und GFP mit mCherry zusammen bei 488 nm Anregung und grüner Emission sind mit $0,30 \pm 0,02$ und $0,29 \pm 0,02$ etwas kleiner als der Durchschnitt. Alle angegebenen Fehler sind die Standardabweichungen. Die spektralen Eigenschaften der verwendeten Filter sind im Anhang in Abbildung A.7 gezeigt.

3.4.3 Einfluss verschiedener Objektive auf die Polarisationsanisotropiemessungen

Da verschiedene Objektive die Polarisation beeinflussen können, wurde im Folgenden untersucht, in welchem Maße dies die hier aufgeführten experimentellen Ergebnisse beeinflusst.

Folgende Objektive wurden untereinander verglichen:

- Nikon CFI P Achromat 40x N.A.: 0,65
- Nikon CFI P Achromat 100x Öl N.A.: 1,25
- Nikon CFI Plan Apochromat VC60x Öl N.A.: 1,4
- Nikon CFI Plan Apochromat VC100x Öl N.A.: 1,4

Bei den ersten beiden Objektiven handelt es sich um Polarisationsobjektive. Die unteren beiden hochklassigen Plan Apo Objektive sind speziell für die Fluoreszenzmikroskopie konzipiert. Um den Einfluss der Objektive für die hier aufgeführten Anwendungen zu untersuchen, wurden U2OS Zellen mit Cerulean, das hohe Anisotropiewerte zeigte, transfiziert und die Polarisationsanisotropie der blauen Fluoreszenz bei polarisierter 405 nm Anregung gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.47 gezeigt. Die gemessenen Anisotropien betragen $0,32 \pm 0,02$ für das 100x PlanApo-, $0,29 \pm 0,02$ für das 100x Pol-, $0,37 \pm 0,03$ für das 40x Pol- und $0,33 \pm 0,02$ für das 60x PlanApo Objektiv. Somit zeigen die beiden PlanApo-Objektive nahezu identische Polarisationsanisotropien. Die des 100xPol liegt leicht darunter und die des 40x Pol leicht darüber. Da für einige geplante biologische Anwendungen die Auflösung des 40x-Objektivs nicht ausreichend ist und das 100x Pol-Objektiv keine Erhöhung der Anisotropie im Vergleich zu den PlanApo-Objektiven brachte, wurde in diesen Experimenten immer eines der beiden PlanApo Objektive verwendet. Die PlanApo Objektive haben nämlich den Vorteil, dass sie wesentlich besser auf Linsenfehler wie sphärische und chromatische Abberation korrigiert sind.

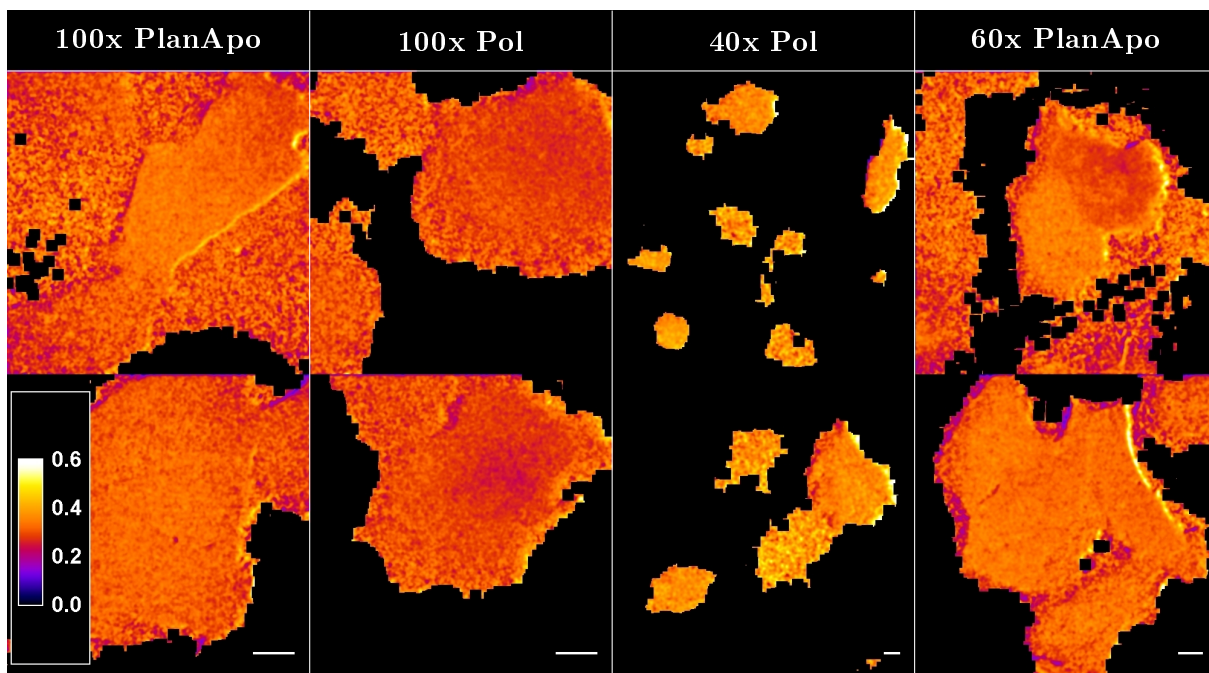


Abbildung 3.47: Einfluss verschiedener Objektive auf die Polarisationsanisotropie der blauen Cerulean Fluoreszenz in U2OS Zellen bei polarisierter 405 nm Anregung. Die Polarisationsanisotropie ist in der unten aufgeführten Farbskala dargestellt. Maßstab jeweils 10 μm .

3.5 Nicht konfokale FRET Fluoreszenzpolarisationsanisotropiemessung

Die Polarisationsanisotropie wurde auch nicht-konfokal gemessen. Der hierfür verwendete Aufbau ist schematisch in Abbildung 3.48a gezeigt. Als Lichtquelle diente eine Nikon Intensilight C-HGFIE, die über einen Lichtleiter mit dem Mikroskop verbunden war. Direkt hinter dieser Einkopplung wurde ein Polarisator in den Strahlengang eingeschoben. Im darauf folgenden Anregungs-Fluoreszenzfilter des Filterwürfels wird der gewünschte Wellenlängenbereich des linear polarisierten Lichts zur Anregung selektiert. Das durch die Anregung emittierte Fluoreszenzlicht von der Probe wird am dichroitischen Spiegel reflektiert (Emissionsfilter des Filterwürfels wurde entfernt) und durchläuft nicht die Spinning-Disks, sondern wird um diese herum geleitet. Anschließend trifft es, analog zu dem zuvor beschriebenen konfokalen Aufbau, nach Passieren des Terrads und des Polarisationsstrahlteilers auf die beiden Kameras.

Der Polarisator ist so in den Anregungsstrahlengang eingebaut, dass die Polarisation des Anregungslichts auf dem Probenstisch die gleiche Orientierung zeigt wie in den konfokalen Messungen zuvor. Um dies einzustellen wurde die Intensität des Anregungslichts auf dem Probenstisch ohne Objektiv hinter einem angebrachten Analysator gemessen. Der Polarisator wurde nun so ausgerichtet, dass die Anregung die gleiche Polarisationsrichtung wie in den konfokalen Messungen zuvor zeigt. Das Ergebnis bei verwendetem CFP-Filterwürfel (ohne Emissionsfilter) ist in Abbildung 3.48b gezeigt (vergleiche konfokale Methode Abbildung 3.41). Messungen mit dem GFP-Filterwürfel ergaben vergleichbare Ergebnisse.

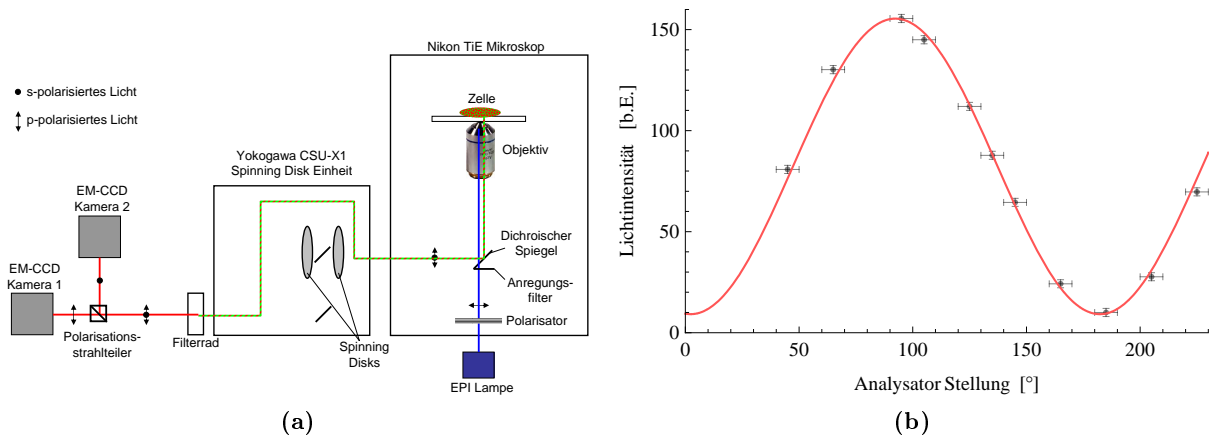


Abbildung 3.48: Schematischer Aufbau für die nicht konfokale FRET Methode und Polarisation der Epi-Fluoreszenzanregung. (a): Schematische Darstellung des Aufbaus zur nicht konfokalen Messung der Fluoreszenz-Polarisationsanisotropie. (b): Polarisation der Epi-Fluoreszenzanregung mit eingebautem Polarisor, Anregungsfilter und dichroitischem Spiegel des CFP-Filterwürfels. Gemessen mit einem Analysator auf dem Probentisch und ohne Objektiv. Fit nach Formel 3.27 ergibt: $T_1=155,4$; $T_2=9,2$; $s=-92^\circ$

Im Folgenden sind typische Messungen mit den oben bereits beschriebenen blau/gelb und grün/rot fluoreszierenden FRET Konstrukten gezeigt.

Abbildung 3.49 zeigt die Polarisationsanisotropie der gelben Fluoreszenz bei Verwendung des Anregungsfilters für das blaue Chromophor Cerulean. Die genauen spektralen Eigenschaften der verwendeten Filter sind im Anhang in Abbildung A.6 dargestellt. Die verschiedenen transfizierten Zellen zeigen alle ein deutliches Fluoreszenzsignal. Die Polarisationsanisotropien betragen im Mittel für Cerulean $0,17 \pm 0,02$, für Venus $0,16 \pm 0,01$, für doppeltransfizierte Zellen mit Cerulean und Venus $0,18 \pm 0,01$, für C5V $0,03 \pm 0,02$ und für C5A $0,17 \pm 0,02$ (Fehlerangaben entsprechen Standardabweichung). Somit sind diese Werte, im Vergleich zur konfokalen Methode, um ca. 0,15 niedriger (vergleiche Abschnitt 3.4.1). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der konfokalen Methode, ist auch hier eine deutliche Reduktion der Polarisationsanisotropie für C5V um ca. 0,15 zu erkennen.

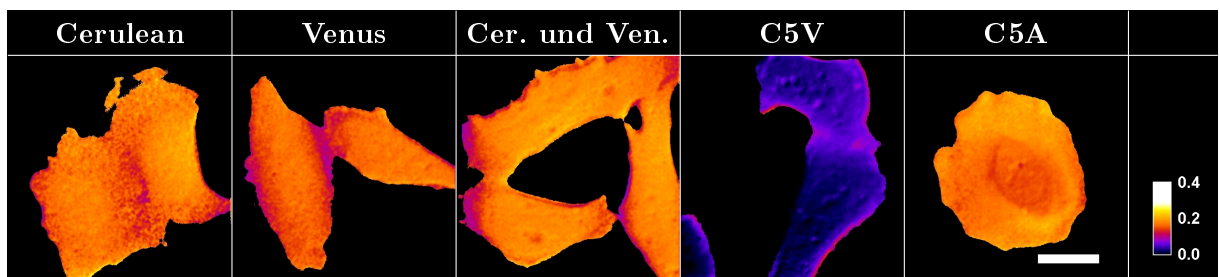


Abbildung 3.49: Polarisationanisotropie mit der nicht konfokalen Messmethode für blau/gelb fluoreszierende FRET Konstrukte. Die verwendeten Chromophore und Konstrukte (in Abbildung 3.45 genauer beschrieben), wurden in U2OS Zellen transfiziert. Die Fluoreszenz wurde mit dem Anregungsfilter für Cerulean angeregt. Die gelbe Emissionsfluoreszenz wurde gemessen und die Polarisationanisotropie bestimmt. Maßstab: 20 μm .

Auch für die rot/grün fluoreszierenden FRET Konstrukte wurde die Polarisationsanisotropie mit der nicht konfokalen Methode bestimmt. U2OS Zellen, transfiziert mit GFP, pByffu oder GFP und mCherry wurden untersucht. Die Anregung erfolgte für alle mit dem Anregungsfilter

für den grün fluoreszierenden Donor GFP. Mit dem entsprechenden Emissionsfilter wurde die Polarisationsanisotropie der roten Fluoreszenz gemessen. Die genauen spektralen Eigenschaften der verwendeten Filter sind im Anhang in Abbildung A.8 dargestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.50 gezeigt. Die Polarisationsanisotropie für GFP beträgt im Mittel $0,13 \pm 0,01$, die für GFP und mCherry $0,15 \pm 0,01$ und die für pByffu $0,07 \pm 0,03$. Wie bei der konfokalen Messmethode sind die Werte somit für pByffu gegenüber denen von GFP und GFP mit mCherry zusammen stark reduziert, liegen aber alle deutlich unter den mit der konfokalen Methode bestimmten (vergleiche Abschnitt 3.4.2).

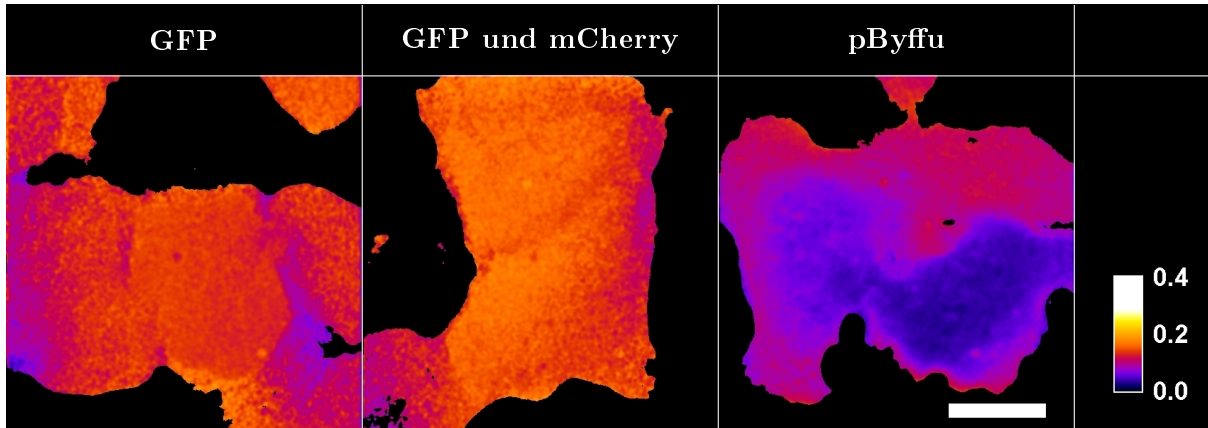


Abbildung 3.50: Polarisationsanisotropie mit der nicht konfokalen Messmethode für grün/rot fluoreszierende FRET Konstrukte. Die verwendeten Chromophore und Konstrukte (in Abbildung 3.46 genauer beschrieben) wurden in U2OS Zellen transfiziert. Die Fluoreszenz wurde mit dem Anregungsfilter für GFP angeregt. Die rote Emissionsfluoreszenz wurde gemessen und die Polarisationsanisotropie bestimmt. Maßstab: 20 μm .

3.6 Experimentelle Anwendungen der polarisationsanisotropiebasierten FRET Messtechnik

Nachdem die Funktionalität der polarisationsanisotropiebasierten FRET Messtechnik mittels der blau/gelb und grün/rot fluoreszierenden FRET-Standards C5V und pByffu validiert wurde, konnte das System in biologischen Anwendungen getestet werden. Unterschiede in der Chromatinkondensation und die Focibildung des DNA-Reparaturproteins 53BP1 nach Ionenbestrahlung wurden in ihrer Auswirkung auf FRET Signale analysiert. Die Untersuchungen zu 53BP1 basieren auf homoFRET, das den Energieübertrag zwischen zwei gleichen Chromophoren beschreibt.

3.6.1 Experimente zur Bestimmung der Chromatinkondensation

Zur Untersuchung der Chromatinkondensation mittels FRET standen HeLa Zellen zur Verfügung, in denen manche H2B-Histone mit GFP und andere mit mCherry markiert sind (Llères et al., 2009). Kondensiert das Chromatin in den Zellen, so kommen sich grün und rot markierte Histone näher und FRET ist nach Llères et al. (2009) mit der auf Fluoreszenzlebenszeit basierten Methode detektierbar. Dekondensiert das Chromatin, so verschwindet dieser Effekt wieder. Dies sollte mit der hier beschriebenen FRET Messtechnik mittels Fluoreszenzpolarisationsanisotropie untersucht werden. Chromatin kondensiert in Zellen auf verschiedene Weise. In jeder Interphasezelle

gibt es kondensierte und nicht kondensierte Bereiche. In den während der Mitose auftretenden Chromosomen ist das Chromatin besonders stark für die Zellteilung kondensiert. Außerdem kann die Kondensation durch chemische Behandlungen beeinflusst werden. Wie auch in [Llères et al. \(2009\)](#) beschrieben, führt ATP-Entzug zur Kondensation, während TSA-Behandlung das Chromatin dekondensiert. All diesen experimentellen Ansätzen wurde hier nachgegangen. Abbildung 3.51 zeigt Fluoreszenz- und Polarisationsanisotropiebilder der stabil transfizierten Hela Zellen. Die Zellen zeigten bei 488 nm Anregung sehr deutliche grüne und bei 561 nm Anregung sehr deutliche rote Fluoreszenz (siehe letzten beiden Spalten in Abbildung 3.51). Auch bei 488 nm Anregung ist ein sehr deutliches rotes Fluoreszenzsignal detektierbar (siehe 2. Spalte). Die Polarisationsanisotropie dieser Fluoreszenz ist in der 1. Spalte gezeigt. Die spektralen Eigenschaften der verwendeten Filter sind im Anhang in Abbildung A.7 dargestellt. Die Polarisationsanisotropie beträgt in den Zellen im Mittel $0,32 \pm 0,02$. Anisotropieänderungen in den dichten Chromatinbereichen der Interphasezellen um die Nukleoli und am Zellkernrand waren nicht zu beobachten. Auch die mitotische Zelle in der Mitte der Abbildung zeigt keine merkliche Änderung der Polarisationsanisotropie.

Auch die Behandlung der Zellen mit $0,66 \mu\text{M}$ TSA für 4 h und 24 h, sowie der ATP-Entzug durch Inkubation in 10 mM Natriumazid und 50 mM Deoxyglucose änderte die Polarisationsanisotropie nicht merklich (Daten nicht gezeigt).

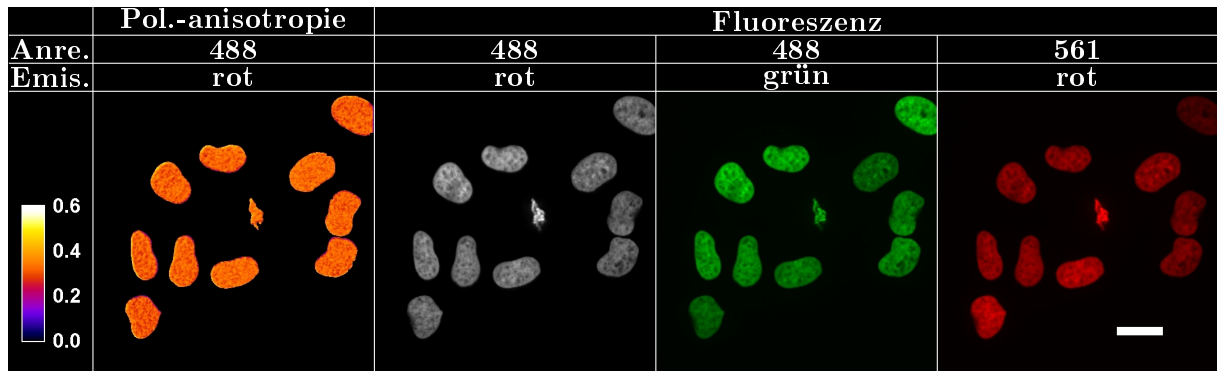


Abbildung 3.51: FRET Messung von Hela Zellen stabil transfiziert mit H2B-GFP und H2B-mCherry. Im Zentrum des Bildes befindet sich eine mitotische Zelle. Maßstab: $20 \mu\text{m}$.

3.6.2 homoFRET Messungen von 53BP1 nach Au-Ionenbestrahlung

Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen FRET-Aufbau soll es in Zukunft möglich sein, Proteininteraktionen nach strahlungsinduzierter DNA-Schädigung zu untersuchen. In ersten Experimenten wurde das Verhalten des Reparaturproteins 53BP1 analysiert. U2OS Zellen mit stabil transfiziertem 53BP1-GFP wurden mit Au-Ionen unter einem flachen Winkel bestrahlt, so dass das Protein 53BP1 Foci entlang des streifenförmigen DNA-Schadens bildete. Die FRET-Polarisationsanisotropiemethode ermöglicht es auch Interaktionen zwischen Proteinen zu messen, wenn diese mit den gleichen Chromophoren markiert sind. Man nennt diese Methode homoFRET. Hierbei wirkt GFP somit als Donor und Akzeptor. Wie in den Experimenten zuvor, lässt auch hier eine Reduktion der Polarisationsanisotropie auf FRET schließen. Folglich konnte diese Methode herangezogen werden, um am Schaden gebundene 53BP1-Proteine auf Interaktionen untereinander zu untersuchen. Das GFP Fluoreszenzsignal und dessen Polarisationsanisotropie wurde bei 488 nm Laser-Anregung gemessen (siehe Abbildung 3.52). Die Akkumulation von 53BP1 an

den streifenförmigen DNA-Schadstellen entlang der Au-Ionendurchschüsse ist im Fluoreszenzbild deutlich zu erkennen. Die mittlere Polarisationsanisotropie in den beiden gezeigten Zellen beträgt $0,29 \pm 0,04$. Eine Reduktion innerhalb der Streifen, die auf eine Interaktion zwischen 53BP1-Proteinen schließen ließe, ist allerdings nicht zu erkennen.

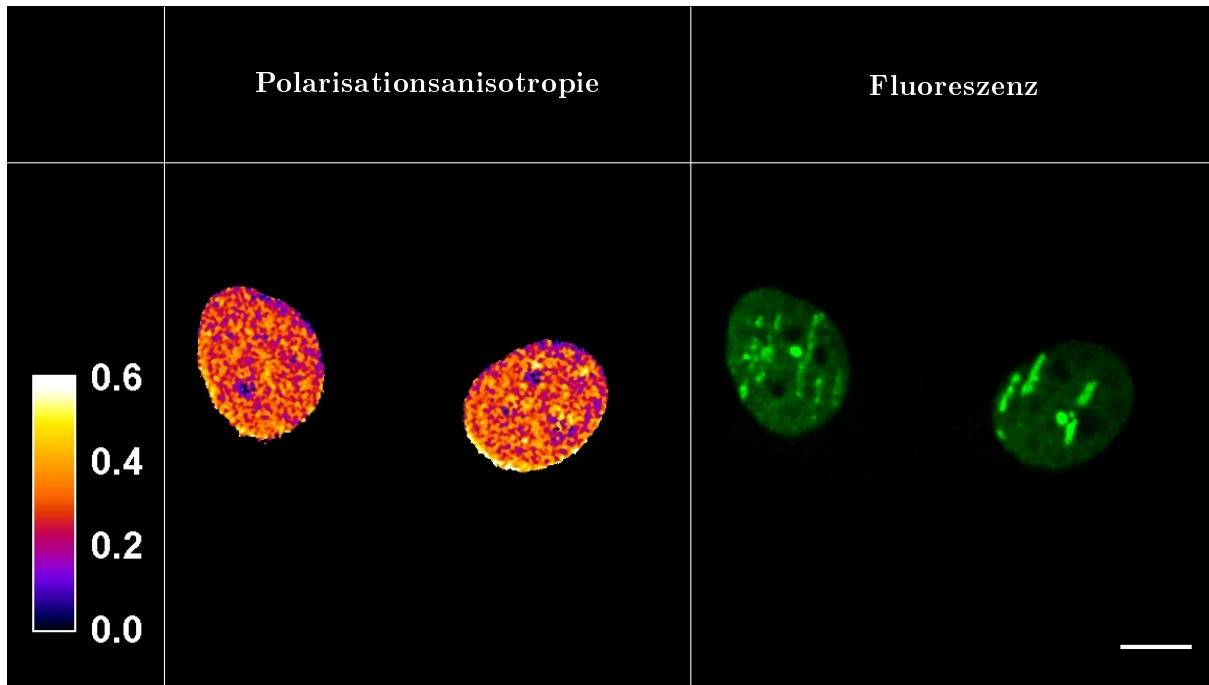


Abbildung 3.52: FRET Analyse von U2OS Zellen stabil transfiziert mit 53BP1-GFP nach Au-Ionenbestrahlung. Das streifenförmige DNA-Schadensmuster entlang der Ionendurchschüsse ist im Fluoreszenzlicht rechts deutlich zu erkennen. Die linke Hälfte der Abbildung zeigt die Polarisationsanisotropie der grünen Fluoreszenz bei 488 nm Laseranregung. Maßstab: 10 μm .

3.7 FRET Detektion durch Akzeptorbleichen

Wie in Abschnitt 1.4.2 bereits erwähnt, gibt es verschiedene Methoden um FRET zu messen. Neben der hier fast ausschließlich beschriebenen Methode der Fluoreszenzpolarisationsanisotropie ist es auch möglich FRET mittels Akzeptorbleichen zu detektieren. Durch das selektive Bleichen des Akzeptors, wird dieser photochemisch zerstört und kann nicht weiter als Akzeptor dienen. Folglich gibt der Donor auch einen Teil der Energie, die er zuvor über FRET an den Akzeptor abgegeben hätte nun als Fluoreszenz ab. Somit steigt das Fluoreszenzsignal des Donors nach dem Bleichen des Akzeptors an. Allerdings ist anzumerken, dass diese Art von Experiment nicht reversibel ist. Ist der Akzeptor einmal gebleicht, kann er nicht mehr als solcher dienen. Da die Methode aber vor Beendigung eines Experiments positive Ergebnisse bestätigen kann, wurde sie für das zuvor beschriebene blau/gelbe FRET-Konstrukt C5V in lebenden U2OS-Zellen untersucht. Abbildungen 3.53 zeigt die Donor- und Akzeptorfluoreszenz vor und nach dem Bleichen an einem Beispiel. Das gelb fluoreszierende Venus wirkt als Akzeptor und das blau fluoreszierende Cerulean als Donor. Zum Akzeptorbleichen wurden die Zellen für ca. 2 min mit voller Lichtleistung des 488 nm und des 568 nm Lasers belichtet. Der Bleicheffekt des Akzeptors ist deutlich zu sehen. Die Fluoreszenzintensität des Akzeptors in den drei gezeigten Zellen reduziert sich auf

5 % \pm 1 % (letzte Spalte), während sich die des Donors auf 291 % \pm 27 % der Intensität vor dem Bleichen erhöht (zweite Spalte). Die gelbe Fluoreszenz bei 405 nm Anregung, die bei intensitätsbasierten FRET Messungen als FRET Signal gilt, nimmt durch das Bleichen, wie in Spalte eins zu sehen, ebenfalls sehr deutlich ab. Sie reduziert sich auf 28 % \pm 5 % der Anfangsintensität.

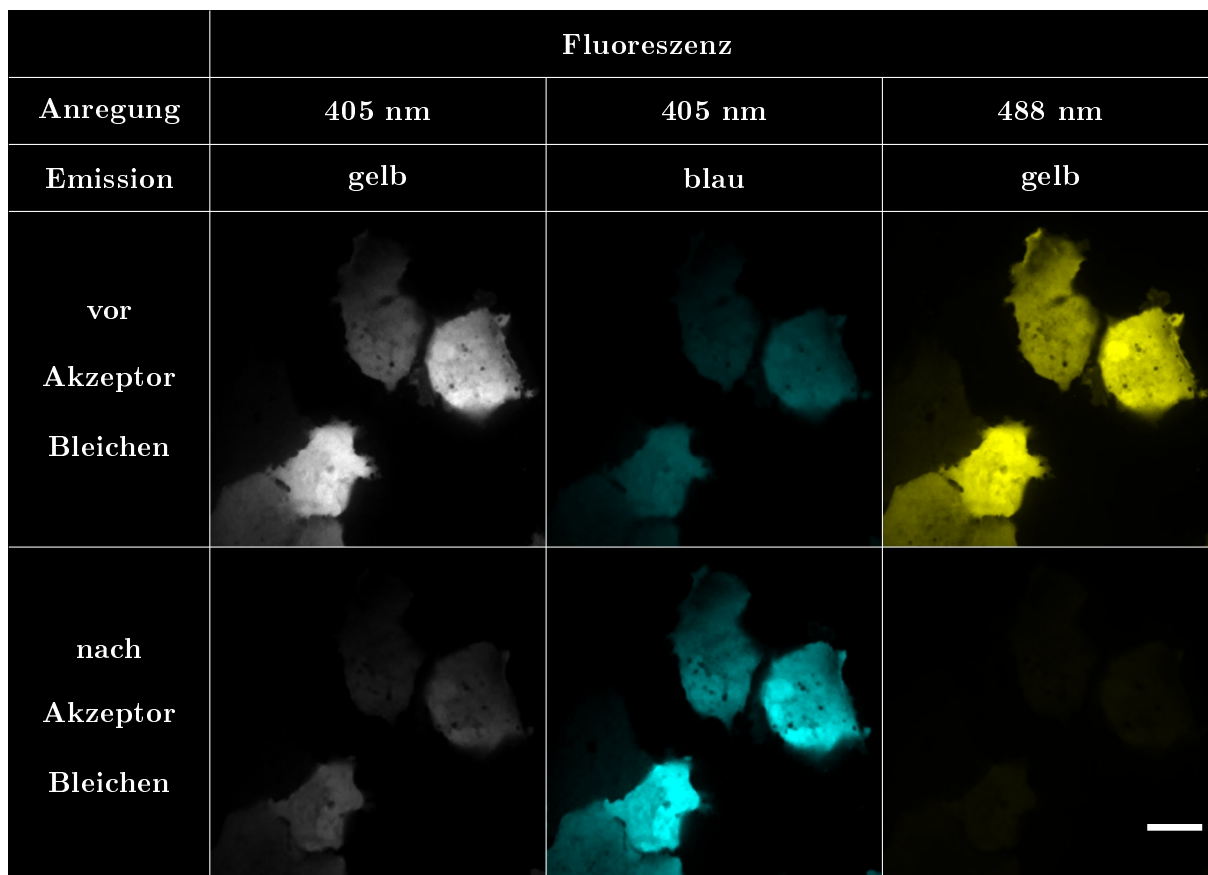


Abbildung 3.53: Messung von FRET durch Akzeptorbleichen. Das Fluoreszenzsignal von C5V, in U2OS Zellen transfiziert, vor und nach dem Bleichen des Akzeptors. Maßstab 20 μm .

Diskussion

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurden das dynamische Verhalten und die Bindeeigenschaften der DNA-Reparaturproteine NBS1, MDC1, 53BP1 und ATR nach dicht ionisierender Strahlung in lebenden humanen Zellen untersucht, um mechanistische Einblicke in die molekularen Prozesse der frühen zellulären Schadensantwort zu erhalten. Hierbei wurde insbesondere der Einfluss von hohen DNA-Schadensdichten nach Ionenbestrahlung analysiert.

Im Folgenden wird zunächst die Mobilität der Proteine in unbestrahlten Zellen diskutiert. Um das Bindeverhalten der Proteine am DNA-Schaden charakterisieren und zu quantifizieren zu können wurden verschiedene mathematische Modelle verwendet. Die Voraussetzungen und Einschränkungen dieser Modelle werden erörtert. Anschließend werden die Ergebnisse zur Akkumulation und zu den Bindeeigenschaften der Proteine an geschädigter DNA diskutiert.

Im zweiten Abschnitt werden der entwickelte fluoreszenzpolarisationsbasierte FRET Aufbau sowie die ersten damit gewonnenen Ergebnisse diskutiert.

4.1 Dynamisches Verhalten der Proteine in unbestrahlten Zellen

4.1.1 Reines Diffusionsverhalten

Gehen die Proteine in unbestrahlten Zellen keinerlei Bindung ein, so ist reines Diffusionsverhalten zu erwarten. Die Diffusionskonstante $D \left[\frac{m^2}{s} \right]$ wird durch die Stokes-Einstein-Gleichung für Brown'sche Bewegung beschrieben:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_b} \quad (4.1)$$

mit k_B der Boltzmannkonstante ($1,38 \cdot 10^{-23} \frac{Nm}{K}$), T der absoluten Temperatur $[K]$, η der Viskosität $\left[\frac{Ns}{m^2} \right]$ der Flüssigkeit und r_b dem Radius eines kugelförmigen Teilchens.

Die Diffusionskonstante bestimmt das mittlere Verschiebungsquadrat, welches in drei Dimensionen durch folgende Formel gegeben ist:

$$\langle r^2 \rangle = 6Dt \quad (4.2)$$

Folglich nimmt D mit abnehmendem Teilchenradius zu und das mittlere Verschiebungsquadrat wird größer. Kleine Teilchen zeigen somit eine höhere Mobilität.

Liegt ein Konzentrationsgradient $\nabla c(\vec{r}, t)$ vor, so lässt sich der resultierende Fluss $J(\vec{r}, t)$ durch das erste Fick'sche Gesetz beschreiben:

$$\vec{J}(\vec{r}, t) = -D \nabla c(\vec{r}, t) \quad (4.3)$$

Aus der Massenerhaltung folgt das zweite Fick'sche Gesetz:

$$\frac{\partial c(\vec{r}, t)}{\partial t} = \nabla (D \nabla c(\vec{r}, t)) \quad (4.4)$$

(Zusammengefasst von [Dix und Verkman, 2008](#))

Diffusionsverhalten von GFP in wässriger Lösung

Kristallstrukturanalysen des GFP-Moleküls zeigten, dass dieses eine zylindrische Struktur mit einer Höhe von 42 \AA und einem Durchmesser von 24 \AA aufweist ([Ormö et al., 1996](#)). Nimmt man vereinfacht eine kugelförmige Molekülgeometrie mit einem Radius von 17 \AA an, so ergibt sich nach Gleichung 4.1 eine Diffusionskonstante D für GFP in Wasser von $D=126 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ (bei $T=20^\circ\text{C}$, $\eta=1,002 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$) bzw. $D=193 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ (bei $T=37^\circ\text{C}$, $\eta=0,6915 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$) ([Lide, 1990](#), Seite F-40). Experimentelle Messungen von GFP in wässriger Lösung ergaben Diffusionskonstanten im Bereich von $76 - 87 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ bei Raumtemperatur ([Terry et al., 1995](#); [Swaminathan et al., 1997](#); [Arrio-Dupont et al., 2000](#); [Pack et al., 2006](#); [Bancaud et al., 2009](#)). Nach diesen Messungen ergibt sich, gemäß Gleichung 4.1, ein Stokesradius für GFP von $r_b=24,6 \text{ \AA}$.

Diffusionsverhalten von GFP in eukaryotischen Zellen

Wie in der Literatur beschrieben, ist die Diffusion in eukaryotischen Zellen deutlich langsamer als in wässriger Lösung. Im Zytoplasma wurde eine um den Faktor 3 - 4 verlangsamte Diffusion gemessen ([Luby-Phelps et al., 1986](#); [Kao et al., 1993](#); [Klonis et al., 2002](#)), mit Werten von $16 - 27 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ ([Yokoe und Meyer, 1996](#); [Swaminathan et al., 1997](#); [Arrio-Dupont et al., 2000](#); [Pack et al., 2006](#)). Für die Diffusion im Zellkern von reinem GFP wurden Diffusionskonstanten im Bereich von $5 - 87 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ gemessen ([Seksek et al., 1997](#); [Houtsmuller et al., 1999](#); [Calapez et al., 2002](#); [Sprague et al., 2004](#); [Braga et al., 2004](#); [Beaudouin et al., 2006](#); [Pack et al., 2006](#); [Bancaud et al., 2009](#); [Michelman-Ribeiro et al., 2009](#); [Dross et al., 2009](#)). Da die Bandbreite der Messwerte relativ groß ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Unterschiede, zumindest zum Teil, zelllinienspezifisch bedingt sein könnten. [Pack et al. \(2006\)](#) und [Dross et al. \(2009\)](#) untersuchten die Diffusion unter gleichen experimentellen Bedingungen für verschiedene Zelllinien. Sie beobachteten leichte Unterschiede, was die Variation zwischen den Zelllinien bestätigt. [McNally \(2008\)](#) und [Phair et al. \(2004b\)](#) publizierten, dass die mit FRAP bestimmten Messwerte für reines GFP in Zellen im Bereich von 10 bis $80 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ liegen sollten.

Die hier vorgestellten Messungen von reinem GFP im Zellkern konnten mit dem Diffusionsfit gut beschrieben werden. Da die Messwerte für lange Zeiten jedoch leicht unter dem Wert von 1 blieben, musste der Plateauwert I_∞ für den Fit auf $0,985$ reduziert werden. Versuche, die Daten mit dem Reaktionsfit zu beschreiben, führten in keinem Fall zu einem guten Fitergebnis. Dies bestätigt die Erwartungen, dass GFP reines Diffusionsverhalten aufweist. Mit Hilfe des Diffusionsfits

wurde die Diffusionskonstante von reinem GFP experimentell auf den Wert $D_{GFP} = 12 \frac{\mu m^2}{s}$ bestimmt. Allerdings ist zu erwähnen, dass die experimentell bestimmte Diffusionskonstante sehr stark von dem zuvor bestimmten Bleichpunktradius ω abhängt. Er beträgt in diesem Fall $1,5 \pm 0,1 \mu m$. Mit der Standardabweichung von $0,1 \mu m$ ergibt sich ein Wertebereich für D_{GFP} von $10,5 \frac{\mu m^2}{s}$ für $\omega=1,4 \mu m$ bis $13,8 \frac{\mu m^2}{s}$ für $\omega=1,6 \mu m$.

Die hier bestimmte Diffusionskonstante für reines GFP von $12 \frac{\mu m^2}{s}$ ist somit in Übereinstimmung mit den Werten aus der Literatur, befindet sich aber am unteren Ende des publizierten Wertebereichs.

Für die verlangsamte Diffusion in Zellen, verglichen zu der in wässriger Lösung, kann es verschiedene Gründe geben. In Frage kommen, dass die Viskosität des Zyto- bzw. Nukleoplasmas höher ist, dass die Proteine in größeren Komplexen diffundieren, dass die Moleküle transient gebunden werden, oder dass die Molekültranslation durch Stöße mit festen Zellstrukturen verlangsamt ist. Ferner kann ein mit Molekülen überfülltes Zyto- oder Nukleoplasma die Diffusion beeinträchtigen (Kao et al., 1993; Klonis et al., 2002; Lippincott-Schwartz et al., 2001). Einige dieser Aspekte werden im Folgenden näher diskutiert. Luby-Phelps et al. beschrieben in zwei Publikationen die Diffusion im Zytoplasma als Diffusion durch ein effektives Netz. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Porengröße des Netzes im Bereich von 200 bis 400 Å liegen könnte (Luby-Phelps et al., 1986), und dass Teilchen mit einem Radius größer als 260 Å evtl. gar nicht mehr im Zytoplasma diffundieren könnten (Luby-Phelps et al., 1987). In einer aktuellen Studie untersuchten Kühn et al. (2011) die Diffusion in der Zelle und im Zellkern. Sie beschrieben hierbei ein Modell, in welchem das Zytoplasma aus einer viskosen flüssigen Phase, dem Zytosol und aus einer nicht flüssigen, festen Phase z. B. dem Zytoskelett besteht. Entsprechendes gilt für das Nukleoplasma, bestehend aus Nukleosol und fester Struktur z.B. Chromatin. Auf Basis dieses Modells untersuchten sie zwei verschiedene Zelllinien und konnten die Diffusion separat für Zytoplasma und Zytosol bzw. Nukleoplasma und Nukleosol, sowie die Porösität der Strukturen bestimmen. Die für das Zytosol bzw. Nukleosol bestimmte Diffusionskonstante war folglich immer größer als die des Zyto- bzw. Nukleoplasmas. Trotz der postulierten porösen Struktur des Chromatins, die die Diffusion verlangsamen kann, zeigte sich in allen bisherigen Experimenten, dass selbst die dichtesten Heterochromatinbereiche auch für große Moleküle von ca. 120 bis 150 kDa (Bancaud et al., 2009; Dross et al., 2009) oder sogar bis 580 kDa (Lukacs et al., 2000) noch gut zugänglich sind. Aus ähnlichen Experimenten zur Diffusion im Zellkern schlussfolgerten Wachsmuth et al. (2000), dass es nicht ausreicht die Ergebnisse mit dem normalen Diffusionsmodell zu beschreiben und dass deshalb ein zweikomponentiges Modell nötig sei, wobei die zweite Komponente eine um ein bis zwei Größenordnungen kleinere Diffusionskonstante zeige als die erste. Alternativ zu dem zweikomponentigen Modell schlugen die Autoren anormales Diffusionsverhalten vor. Anormales Diffusionsverhalten beschreibt den Fall, für den das mittlere Verschiebungsquadrat nicht mehr linear mit der Zeit wächst (siehe Gleichung 4.2), sondern proportional zu t^α ist. Während $\alpha = 1$ normales Diffusionsverhalten mit Brown'scher Bewegung beschreibt, bezeichnet $0 < \alpha < 1$ anormale Subdiffusion und $\alpha > 1$ anormale Superdiffusion (z. B. Lubelski und Klafter, 2008). Weiss et al. (2004) konnten zeigen, dass anormale Subdiffusion wahrscheinlich durch die molekulare Überfüllung im Zytoplasma bedingt ist. Weitere nähere Untersuchungen zu diesem Thema machten Bancaud et al. (2009). Wie von ihnen zusammengefasst, besitzt der Zellkern eine sehr hohe Makromoleküldichte. Diese molekulare Überfüllung bewirkt neben einem Volumenausschluss auch eine verlangsamte Diffusion und verschiebt Bindungsreaktionen auf die Seite des gebundenen Zustands. So bleiben z. B. chromatininteragierende Proteine, aufgrund der durch die molekulare Überfüllung verursachten

Affinität, transient im Heterochromatin gefangen. Dies verlangsamt ihre Diffusion. Aufgrund der experimentellen Ergebnisse argumentierten die Autoren schließlich für eine fraktale Struktur des Chromatins.

Zusammengefasst zeigt GFP in Zellen eine deutlich reduzierte Diffusionskonstante, verglichen zu der in wässriger Lösung. Die verminderte Diffusion wird wahrscheinlich durch Stöße mit festen Zellstrukturen und durch die molekulare Überfüllung bedingt.

4.1.2 Mobilität der Reparaturproteine ATR, NBS1, MDC1 und 53BP1 in unbestrahlten Zellen

Unter der Annahme, dass alle Proteine die gleiche Dichte besitzen und kugelförmig Geometrie aufweisen, lässt sich die freie Diffusionskonstante $D_{GFP-Protein}$ eines GFP gekoppeltes Proteins mit der Masse $m_{GFP-Protein}$ durch folgende Formel beschreiben. Das Protein darf dabei keinerlei Bindungen eingehen (McNally, 2008).

$$D_{GFP-Protein} = D_{GFP} \cdot \left(\frac{m_{GFP-Protein}}{m_{GFP}} \right)^{-\frac{1}{3}} \quad (4.5)$$

Hierbei ist D_{GFP} die Diffusionskonstante von reinem GFP im gleichen Milieu und m_{GFP} die Masse von reinem GFP ($m_{GFP} = 27$ kDa). Mit der experimentell bestimmten Diffusionskonstante für GFP ($D_{GFP} = 12 \frac{\mu m^2}{s}$) ist diese Abhängigkeit in Abbildung 4.1 dargestellt.

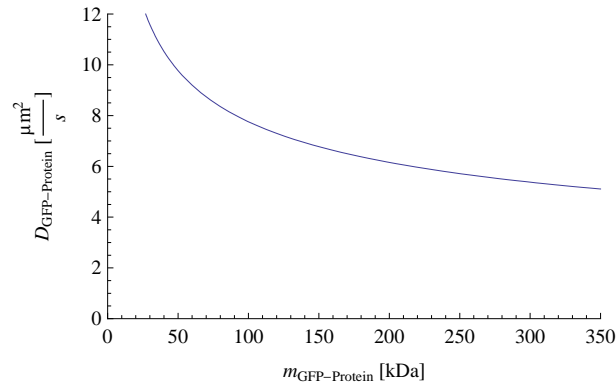


Abbildung 4.1: Theoretische Abhängigkeit der Diffusionskonstante von der Proteinmasse.

Die Diffusionskonstanten D der GFP-markierten Proteine ATR, NBS1, MDC1 und 53BP1 (nach Formel 4.5 berechnet) sind im Überblick in Tabelle 4.1 gezeigt. D_{eff} ist die experimentell bestimmte effektive Diffusionskonstante. γ_{eff} ergibt sich durch Division von D durch D_{eff} . F_{eq} bezeichnet den Anteil der ungebundenen Proteine im Gleichgewicht und lässt sich durch $1/\gamma_{eff}$ berechnen. NBS1 ist mit einem Tandem-GFP, alle anderen Proteine mit einem GFP markiert. Aus diesem Grund trägt NBS1 hier die Bezeichnung NBS1-GFP-GFP.

Tabelle 4.1: Theoretische freie Diffusion und gemessene effektive Diffusion der untersuchten Proteine.

	GFP	ATR-GFP	NBS1-GFP-GFP	MDC1-GFP	53BP1-GFP
Masse [kDa]	27	318	137	257	244
$D \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}} \right]$	12	5,3	7,0	5,7	5,8
$D_{eff} \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}} \right]$	-	0,50	0,25	0,029	0,0125
γ_{eff}	-	10,6	27,5	197	460
F_{eq}	-	9 %	4 %	0,5 %	0,2 %

Während sich die Fits mit dem Diffusionsmodell sehr gut in die Messdaten von NBS1-GFP-GFP und ATR-GFP in unbestrahlten Zellen einpassten, war dies für MDC1-GFP und 53BP1-GFP nicht der Fall. Aus diesem Grund sollten die bestimmten effektiven Diffusionskonstanten für MDC1-GFP und 53BP1-GFP aus Tabelle 4.1 in diesem Zusammenhang mehr als Beschreibung der Größenordnung der Mobilität im Vergleich zu der anderer Proteine verstanden werden. Vergleicht man unter diesen Voraussetzungen die in Tabelle 4.1 dargestellten Werte für die vier Proteine, so ist deutlich zu erkennen, dass in allen Fällen die experimentell bestimmte effektive Diffusionskonstante der Proteine D_{eff} kleiner ist als die mit Formel 4.5 berechnete und erwartete Diffusionskonstante D . Wie an γ_{eff} zu sehen beträgt das Verhältnis beider Größen zwischen 10,6 für ATR-GFP und 460 für 53BP1-GFP. Im Folgenden werden jedoch zunächst die experimentell bestimmten Messwerte D_{eff} mit publizierten Daten zur Proteinmobilität im Zellkern verglichen, bevor anschließend die verringerte Mobilität und die Werte von γ_{eff} und F_{eq} diskutiert werden.

Aktueller Kenntnisstand zur Mobilität von Proteinen im Zellkern

Der Vergleich der hier beschriebenen Messwerte mit anderen ist oft sehr schwierig, da in Publikationen teilweise komplett auf die mathematische Modellierung von FRAP Kurven verzichtet wird, andere Modelle verwendet werden (siehe auch Abschnitt 4.2), oder die Messdaten teils unterschiedlich normiert werden. Bekker-Jensen et al. (2005) untersuchten die Mobilität von 53BP1-GFP in unbestrahlten Zellen. Das Plateau wurde nach ca. 60 s erreicht und damit deutlich früher als in den hier gezeigten Messungen, in denen die Fluoreszenz noch 600 s nach dem Bleichen leicht ansteigt. Die Mobilität von NBS1-GFP-GFP und MDC1-GFP in unbestrahlten Zellen wurde von Lukas et al. (2003, 2004) untersucht. Die Messungen von NBS1-GFP-GFP erreichten bereits nach ca. 2 bis 3 s annähernd den Plateauwert, die von MDC1-GFP nach ca. 7 s. Die Mobilität von NBS1-GFP-GFP war folglich, analog zu den hier vorgestellten Ergebnissen höher als die von MDC1-GFP. In den hier gezeigten Messungen erreicht NBS1 den Plateauwert allerdings erst nach ca. 30 s und MDC1 nach ca. 300 s. In den publizierten Messungen wurden die FRAP-Kurven nur bis 4 s und 7 s nach dem Bleichen aufgezeigt. Folglich ist nicht ersichtlich, ob die Daten nach den genannten Zeitpunkten noch weiter ansteigen. Lukas et al. (2004) bestimmten auch die effektive Diffusionskonstante von NBS1-GFP-GFP und MDC1-GFP. Sie erhielten für NBS1-GFP-GFP Werte von $D_{eff}=2,53 \pm 0,3 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ und für MDC1-GFP $D_{eff}=2,08 \pm 0,29 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Zur Bestimmung der Konstanten wurde das von Ellenberg et al. (1997) beschriebene und auch von Essers et al. (2002) angewandte Modell gewählt. Hierbei handelt es sich um eine empirische, eindimensionale Diffusionsgleichung. Wie Ellenberg et al. (1997) zeigten, stimmt dieses Modell nur bis zu einem Fluoreszenzsignal von unter ca. 65 % mit einem zweidimensionalen Modell über-

ein. Aufgrund dessen fitteten [Lukas et al. \(2004\)](#) die Daten nur bis wenige Sekunden nach dem Bleichen und spätere Datenpunkte blieben folglich unbeachtet.

Im Folgenden wird kurz auf die Diffusionseigenschaften von weiteren Proteinen im Zellkern eingegangen, auch wenn diese meist völlig verschiedene strukturelle und mechanistische Eigenschaften besitzen. Dies soll jedoch helfen die Proteinmobilität im Zellkern im Allgemeinen zu verstehen und somit die hier bestimmten effektiven Diffusionskonstanten D_{eff} aus Tabelle 4.1 besser einordnen zu können. Transkriptionsfaktoren und DNA-Reparaturproteine zeigen im Allgemeinen höhere Mobilitäten als Chromatinproteine (z. B. [van Royen et al., 2011](#); [Carrero et al., 2003](#)). Für DNA-Reparaturproteine wurden effektive Diffusionskonstanten von $0,35 \frac{\mu m^2}{s}$ bis $28 \frac{\mu m^2}{s}$ bestimmt ([Houtsmuller et al., 1999](#); [Rodgers et al., 2002](#); [Essers et al., 2002](#)). Weitere Proteine im Kern, wie rRNA Prozessierungs- und Transkriptionsfaktoren zeigten Mobilitäten mit einer effektiven Diffusionskonstanten von $0,24 \frac{\mu m^2}{s}$ bis $13 \frac{\mu m^2}{s}$ ([Phair und Misteli, 2000](#); [Calapez et al., 2002](#); [Michelman-Ribeiro et al., 2009](#)).

Zusammengefasst liegen die Werte der effektiven Diffusionskonstanten von Proteinen im Zellkern in einem Bereich von $0,24 \frac{\mu m^2}{s}$ bis $28 \frac{\mu m^2}{s}$. Die hier bestimmten effektiven Diffusionskonstanten von ATR-GFP und NBS1-GFP-GFP liegen innerhalb dieser Messspanne im unteren Bereich. Die Werte für MDC1-GFP und 53BP1-GFP liegen jedoch deutlich darunter.

Gründe für die verlangsamte Diffusion der untersuchten Proteine

Wie bereits erwähnt und in Tabelle 4.1 gezeigt, weichen die experimentell bestimmten Diffusionskonstanten D_{eff} stark von den theoretisch erwarteten Diffusionskonstanten D ab. Das Verhältnis beider Größen ist durch γ_{eff} gegeben. Es beträgt zwischen 10,6 für ATR-GFP und 460 für 53BP1-GFP. Vermutlich binden die Proteine zusätzlich zur Diffusion an feste Strukturen. Je stärker die Bindung und je mehr freie Bindungsstellen vorhanden sind, umso mehr Protein wird gebunden. Dies wird durch den Wert F_{eq} in Tabelle 4.1 wiedergegeben. Er bezeichnet den Anteil der ungebundenen Proteine im Gleichgewicht. Der immobilisierte Anteil war in allen Fällen sehr hoch. Deshalb wird im Folgenden beschrieben, an welche Proteine und Strukturen die vier Proteine NBS1, ATR, MDC1 und 53BP1 binden können.

Wie in Abschnitt 1.1.2 bereits erläutert, kann **NBS1** an MRE11 binden, wodurch es in den MRN-Komplex eingebunden wird. Außerdem bindet NBS1 an ATM und besitzt mehrere Phosphopeptidbindungsstellen, eine FHA- und zwei BRCT-Domänen. An diese Domänen können neben CtIP, MDC1, ATR und der WRN-Helikase vermutlich auch noch andere Proteine, die nach DNA-Schadensinduktion phosphoryliert werden, binden (zusammengefasst von [Williams et al. \(2010\)](#)). Zusätzlich zu den direkten Bindungen sind weitere Szenarien denkbar. Kann ein Protein, das mit NBS1 interagiert, noch an andere Proteine binden, so kann es als Bindeglied zwischen NBS1 und weiteren Strukturen agieren. Auf diese Weise wird NBS1 wahrscheinlich im MRN-Komplex über MRE11 an die geschädigte DNA gebunden. Für XRS2, dem NBS1 Analog in Hefezellen, wurde die direkte Bindung an die DNA beschrieben ([Trujillo et al., 2003](#)). Ob auch NBS1 solche DNA bindenden Eigenschaften besitzt ist unklar. Unabhängig davon wurde mehrfach eine Interaktion zwischen NBS1 und MDC1, die von der Casein Kinase 2 abhängig ist, beschrieben. Diese Interaktion wird im nächsten Absatz bei der Behandlung der MDC1-Bindungseigenschaften genauer beschrieben.

Sowohl [Jungmichel und Stucki \(2010\)](#) als auch [Coster und Goldberg \(2010\)](#) beschrieben in Übersichtsartikeln die Bindeeigenschaften von **MDC1** mit anderen Proteinen. MDC1 besitzt im Wesentlichen fünf funktionelle Domänen: eine FHA-, eine SDT-, eine TQXF-, eine PST- und eine

BRCT-Domäne. Über die BRCT-Domäne interagiert MDC1 mit der Untereinheit des APC/C (Anaphase promoting complex) CDC27, der DNA-Topoisomerase II und mit γ H2AX. Die PST-Domäne beinhaltet vermutlich eine DNA-PK-Bindungsstelle. An die durch ATM phosphorylierte TQXF-Domäne bindet RNF8. An die FHA-Domäne können CHK2, ATM und Rad51 binden. Eine für diese Arbeit interessante und deshalb genauer beschriebene Interaktion ist die zwischen MDC1 und NBS1 über die SDT-Domäne. In mehreren Publikationen wurde gezeigt, dass MDC1 strahlungsunabhängig von CK2 an mehreren Stellen in der SDT-Domäne phosphoryliert wird, und darüber mit den FHA-Domänen des NBS1-Proteins interagiert ([Chapman und Jackson, 2008](#); [Melander et al., 2008](#); [Spycher et al., 2008](#); [Wu et al., 2008](#)). Wie später noch genauer diskutiert wird, spielt diese Interaktion auch für die NBS1-Akkumulation an DNA-Schadstellen eine entscheidende Rolle. Wie sowohl die Messungen hier als auch die von [Lukas et al. \(2004\)](#) zeigten, sind die effektiven Diffusionskonstanten von NBS1 und MDC1 deutlich verschieden. Deshalb können beide Proteine nicht in einem Holokomplex diffundieren, sondern müssen eher dynamisch interagieren. Auch eine Bindung von MDC1 an 53BP1 wurde beschrieben ([Eliezer et al., 2009](#)).

Wie in Abschnitt 1.1.2 ausgeführt, bindet **53BP1** über seine Tudor Domänen an Histone H3, die am Serin 79 methyliert sind (H3K79me). Im Allgemeinen wird angenommen, dass diese Methylierungsstelle im ungeschädigten Chromatin nicht zugänglich ist und 53BP1 erst nach der Relaxation des Chromatins um den DSB binden kann. [Bekker-Jensen et al. \(2005\)](#) konnten jedoch zeigen, dass 53BP1 auch in unbestrahlten Zellen transient mit am Serin 79 methylierten Histonen H3 (H3K79me) interagieren kann. Dies könnte die stark verringerte Mobilität von 53BP1 in unbestrahlten Zellen erklären. Wie bereits erwähnt, kann 53BP1 auch in unbestrahlten Zellen mit MDC1 interagieren, wodurch 53BP1 über MDC1 an Chromatin binden kann ([Eliezer et al., 2009](#)). Zusätzlich zur Bindung an andere Proteine wurde für 53BP1 eine Oligomerisierung beschrieben ([Adams et al., 2005](#); [Zgheib et al., 2009](#)).

ATR interagiert strahlungsunabhängig mit dem 90 kDa großen ATRIP Protein ([Cortez et al., 2001](#); [Nam und Cortez, 2011](#)). Da [Zou und Elledge \(2003\)](#) aber zeigen konnten, dass die Mehrzahl an ATR nicht an ATRIP gebunden ist, ist diese Interaktion vermutlich sehr transient, bzw. auf einen kleinen Anteil von ATR beschränkt. ATR besitzt keine bekannte DNA-Bindungsdomäne ([Nam und Cortez, 2011](#)), dennoch konnten [Unsal-Kaçmaz et al. \(2002\)](#) zeigen, dass ATR DNA direkt binden kann. Da in ihren Experimenten kein ATRIP zu sehen war schlussfolgerten sie, dass diese Bindungseigenschaften allein von ATR ausgingen. Experimente von [Bomgarden et al. \(2004\)](#) ließen annehmen, dass ATR und ATRIP im Komplex, aber nicht alleine, auch ssDNA binden können die nicht mit RPA dekoriert ist. Dieses sehr unvollständige und teilweise widersprüchliche Bild lässt vermuten, dass eventuelle ATR-DNA Bindungseigenschaften sehr schwach sind. In einer aktuellen Publikation wurde unabhängig davon gezeigt, dass ATR über TOPBP1 auch an, von CK2 phosphoryliertes MDC1 binden kann ([Wang et al., 2011](#)).

Nach diesen Beschreibungen zu den Proteininteraktionen von NBS1, ATR, MDC1 und 53BP1 ist es offensichtlich, dass diese an viele verschiedene Proteine binden können. Aufgrund der Diskrepanzen zwischen D und D_{eff} liegt insbesondere für die Proteinen MDC1 und 53BP1 eine Interaktion mit immobilisierten Strukturen sehr nahe. Für 53BP1 wird dies vermutlich dadurch bedingt, dass es wie von [Bekker-Jensen et al. \(2005\)](#) beschrieben, auch in unbestrahlten Zellen an H3K79me bindet. Dies wird durch weitere Ergebnisse bestätigt, in denen gezeigt werden konnte, dass 53BP1 auch in unbestrahlten Zellen am Chromatin bindet ([Rübe et al., 2011](#)). MDC1 bindet an die phosphorylierte Histonvariante γ H2AX, die um den DSB gebildet wird. Aber auch in unbestrahlten Zellen ist vermutlich ein Teil des H2AXs zu γ H2AX phosphoryliert ([Rogakou et al., 1998](#)), an das MDC1 binden könnte. Dies würde die stark verringerte Mobilität von MDC1 in

unbestrahlten Zellen erklären. Zusätzlich wäre denkbar, dass 53BP1 und MDC1 durch die beschriebene gegenseitige Interaktion, über das jeweilige andere Protein an das Chromatin binden kann (Eliezer et al., 2009). Durch diese verschiedenen Bindungen von 53BP1 und MDC1 an das Chromatin, ließen sich die Abweichungen der entsprechenden Diffusionsfits und die großen Werte für γ_{eff} erklären. Die Tatsache, dass für NBS1 und ATR die γ_{eff} Werte deutlich kleiner waren und die Diffusionsfits sehr gut in die Daten passten, lässt annehmen, dass mögliche Interaktionen von NBS1 und ATR mit immobilisierten Strukturen sehr transient sind. Dies würde vielleicht auch erklären, weshalb Bindungen von 53BP1 und MDC1 an Chromatinstrukturen beschrieben wurden, die für NBS1 und ATR aber umstritten sind.

Wie bereits erwähnt, binden die Proteine nicht nur an immobile Strukturen, sondern können auch mit zahlreichen anderen Proteinen interagieren. Deshalb ist außerdem denkbar, dass die Proteine zum Teil nicht einzeln, sondern in größeren Komplexen diffundieren. Der Zusammenhang zwischen der Protein- bzw. Komplexmasse und der Diffusionskonstante nach Formel 4.5 ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Die Kurve wird mit zunehmender Masse immer flacher. Demnach müssten die Komplexe extrem große Massen annehmen, um die gemessenen Werte von D_{eff} zu erreichen. Diese theoretischen Überlegungen beruhen jedoch auf kugelförmiger Geometrie der Proteine. Haben sie abweichende Geometrien, so nimmt die Diffusionskonstante mit steigender Masse stärker ab. Zusätzlich beruht Gleichung 4.5 auf Diffusion in reiner Flüssigkeit. Wie zuvor schon genauer diskutiert, ist dies für den Zellkern keine exakte Annahme, da sich im Zellkern eine große Menge an Chromatin und an anderen strukturbildenden Filamenten befindet. Somit ist anzunehmen, dass sich eine Art Gitter- oder Netzstruktur bildet, durch die gelöste Proteine hindurch diffundieren (Luby-Phelps et al., 1986). Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob das Chromatingitter die Proteindiffusion beeinflussen könnte, und wenn ja, ab welcher Proteingröße. In Experimenten zum Diffusionsverhalten von Teilchen im Zellkern zeigte sich, dass Proteine bis ca. 500 kDa relativ ungehindert diffundieren können, die Diffusion mit zunehmender Masse der Teilchen aber behindert wird und Dextrane mit einer Masse von 2000 kDa im Zellkern völlig immobil sind (Lukacs et al., 2000; Braga et al., 2004). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass Dextrane im Allgemeinen eine weniger rigide Struktur als Proteine besitzen, weshalb ihre Mobilität bei gleicher Masse deutlich geringer ist (Görisch et al., 2005). NBS1 bildet zusammen mit Rad50 und MRE11 den MRN-Komplex. Mit Massen von 137 kDa für NBS1-GFP-GFP, 154 kDa für Rad50 und 79 kDa für MRE11 hätte der MRN-Komplex eine Gesamtmasse von 370 kDa. Wenn alle drei Proteine in doppelter Ausführung im Komplex gebunden sind (wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben), so wäre die Masse dementsprechend 740 kDa. Dies könnte, nach den oben genannten Ergebnissen, die Diffusion verlangsamen. Wie viele und welche Proteine aber genau im Komplex gebunden sind, ist nicht bekannt. Gleiches gilt für die anderen Proteine MDC1, 53BP1 und ATR. Auch für diese könnte das Diffusionsverhalten durch die Bildung von großen Komplexen verringert sein. Allerdings ist auch hier nicht bekannt, wie viele Proteine und welche in einem solchen Komplex beteiligt sein könnten.

Zusätzlich wird in der Literatur oft argumentiert, dass frei diffundierende Proteine ihre Bindungsstellen nicht effektiv im großen Chromatinnetz finden könnten. Deshalb wurde auch alternatives Translationsverhalten von Kernproteinen vorgeschlagen. Verschiedene Arten der Proteinbewegung fassten van Royen et al. (2011) zusammen. Bei eindimensionalem Diffusionsverhalten gleiten die Proteine entlang des DNA-Strangs. Alternativ hierzu ist die zweidimensionale Diffusion auf der Chromatinoberfläche. Mit experimentellen Ansätzen wurde das Gleiten entlang des Chromatins bereits gemessen (Shimamoto, 1999). Blainey et al. (2009) konnten zusätzlich zeigen, dass acht verschiedene DNA-interagierende Proteine beim Gleiten entlang des Chromatinstrangs, um diesen rotieren. Auch für das DSB-Reparaturprotein Rad51 und den Msh2-Msh6 Reparaturkom-

plex konnte eindimensionales Gleiten entlang des Chromatins gezeigt werden ([Gorman et al., 2007](#); [Granéli et al., 2006](#)). Ein solches Verhalten würde die Diffusion ebenfalls verlangsamen. Jedoch ergeben sich aus dieser Modellvorstellung neue schwerwiegende Probleme, da sich die verschiedenen Proteine gegenseitig stark behindern würden. Deshalb ist anzunehmen, dass derartige Proteintranslationsverhalten auf einige spezielle Fälle beschränkt ist.

4.2 Vergleich der verschiedenen FRAP-Modelle sowie experimentelle Einschränkungen

Vergleich der verschiedenen FRAP-Modelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Modelle zur Beschreibung der FRAP-Kurven verwendet. Sie berücksichtigen verschiedene Aspekte zur Berechnung der Proteinmobilität, wie z.B. die Diffusion des Proteins, die Anzahl der Bindungszustände des Proteins und die räumliche Geometrie (siehe Tabelle 4.2). Die Geometrie beschreibt die Ausdehnung des Zellkerns und die lokalisierte Bindung in Foci. Die Grundlagen zu den Modellen, die bereits in Abschnitt 3.2.5 beschrieben wurden, werden hier genauer diskutiert.

Tabelle 4.2: Modelle zur Beschreibung der Proteinmobilität.

Modell	Diffusion	1. Bindung	2. Bindung	Geometrie
Reaktionsbasiert einkomponentig ^a	-	+	-	-
Reaktionsbasiert zweikomponentig ^a	-	+	+	-
Diffusionsmodell ^b	+	-	-	-
effektives Diffusionsmodell ^c	+	im lokalen Gleichgewicht	-	-
Diffusionsmodell mit einer Bindung ^d	+	+	-	-
Diffusions-Reaktionsmodell ^e	+	kernweit, im lokalen Gleichgewicht	räumlich begrenzt	+
Diffusions-Reaktionsmodell mit vernachlässigbarer lokaler Bindung ^e	+	kernweit, im lokalen Gleichgewicht	räumlich begrenzt, vernachlässigbar	+
Diffusions-Reaktionsmodell reaktionsdominant ^e	vernachlässigbar	vernachlässigbar	räumlich begrenzt	+
Diffusions-Reaktionsmodell mit lokalem Gleichgewicht ^e	+	kernweit, im lokalen Gleichgewicht	räumlich begrenzt, im lokalen Gleichgewicht	+

^anach McNally (2008)

^bnach Axelrod et al. (1976) und Sprague et al. (2004)

^cnach Crank (1975) und Sprague et al. (2004)

^dnach Sprague et al. (2004)

^enach Sprague et al. (2006)

Da durch das Bleichen in FRAP Experimenten lediglich die fluoreszierenden Eigenschaften der Chromophore zerstört werden, jedoch nicht die biologische Funktion der Proteine, ändert sich die Konzentration der freien Bindungsstellen S_{eq} bei einem System im Gleichgewicht nicht. Aus diesem Grund kann das Binden durch den Mechanismus pseudo erster Ordnung beschrieben ($F \xrightleftharpoons[k_{off}]{k_{on}^*} C$) werden. Hierbei wird S_{eq} mit k_{on} zusammengefasst zu k_{on}^* ($k_{on}^* = S_{eq} \cdot k_{on}$). Diese Annahmen setzen voraus, dass sich die Gesamtmenge an Protein und Bindungsstellen während dem FRAP-Experiment nicht ändern. Ferner müssen die Bindungsstellen für die Dauer des FRAP-Experiments immobil sein (Sprague et al., 2004, 2006). All die Modelle beschreiben lediglich einfache Reaktionsschritte nach diesem Schema. Kompliziertere Mechanismen und Prozesse wie Inhibition, Katalyse oder Folgereaktionen sind nicht enthalten.

Das **einkomponentige bzw. zweikomponentige Reaktionsbasierte Modell** beschreibt lediglich eine bzw. zwei derartige Reaktionen. Die Diffusionsprozesse sind sehr schnell im Vergleich zu den Reaktionsprozessen, so dass der gebleichte Fleck quasi instantan mit den diffundierenden Proteinen gefüllt wird. Die verbleibende Fluoreszenzzunahme ist lediglich durch die Reaktionsprozesse bestimmt. Ob die schnelle Diffusion am Anfang detektierbar ist, wird maßgeblich durch die Frequenz der Bildaufnahme bestimmt. Auch aus diesem Grund lässt sich das Modell meist nur auf FRAP-Messungen mit kleiner Bildfrequenz anwenden. Experimentell kann ein solches Verhalten durch variable Bleichfleckgrößen verifiziert werden, wobei sich die gemessenen Kurven nicht ändern dürfen (McNally, 2008). Für die hier vorgestellten Versuche war dies aufgrund der lokalen Schadensbindung jedoch nicht möglich.

Zur Modellierung reiner **Diffusion** wurde das von Axelrod et al. (1976) aufgestellte und von Soumpasis (1983) weiterentwickelte Modell verwendet. Dieses Modell wurde in der Literatur vielfach angewandt. Es ist jedoch zu bedenken, dass es nur die zweidimensionale Diffusion beschreibt. Außerdem wird das Profil des gebleichten Punktes als scheibenförmig und nicht als gaußförmig angenommen. Diese geometrischen Einschränkungen werden später in diesem Kapitel diskutiert.

Ist die Reaktion viel schneller als die Diffusion durch den gebleichten Fleck, so stellt sich ein lokales Gleichgewicht ein (Crank, 1975). Daraus folgt, dass sich an jeder sehr kleinen Stelle innerhalb des gebleichten Punktes die Konzentration der gebundenen Proteine nicht ändert ($\frac{\partial C}{\partial t} = 0$). Unter diesen Voraussetzungen lässt sich das Diffusions-Reaktionsverhalten durch verlangsamte Diffusion beschreiben (Crank, 1975). Dieser Fall wird dann als **effektive Diffusion** bezeichnet. Die bindende und die diffundierende Fraktion verhalten sich wie eine langsam diffundierende Einheit. Die Diffusionskonstante ändert sich von D zu $D_{eff} = \frac{D}{1 + \frac{k_{on}}{k_{off}}}$. Damit gelten auch für diesen Fall die gleichen Einschränkungen wie für das Diffusionsmodell.

Das hier verwendete **Diffusionsmodell mit einer Bindung** entspricht dem von Sprague et al. (2004) beschriebenen "Reaktions-Diffusionsmodell". Es beschreibt neben der Diffusion noch zusätzlich eine Bindung nach pseudo erster Ordnung. Im Gegensatz zum effektiven Diffusionsmodell, unterliegt die Bindung nicht der Einschränkung, dass sie sehr schnell im Vergleich zur Diffusion sein muss.

Das verwendete **Diffusions-Reaktionsmodell**, das von Sprague et al. (2006) veröffentlicht wurde, wurde zuvor bereits ausführlich beschrieben (siehe Abschnitt 3.2.5). Es berücksichtigt als einziges von den hier verwendeten Modellen die Ausdehnung des Zellkerns und die Lokalisation der Bindungsstellen. Es beschreibt eine zellkernweite Diffusion mit einer, ebenfalls kernweiten, sehr schnellen Bindung, die sich somit im lokalen Gleichgewicht befindet. Die kernweite Mobilität wird deshalb als effektive Diffusion beschrieben. Zusätzlich beschreibt das Modell eine räumlich

begrenzte Bindung innerhalb des Zellkerns. Abhängig von den Eigenschaften der kernweiten und der räumlich begrenzten Bindung lassen sich einige Sonderfälle unterscheiden: Ist die räumlich begrenzte Bindung sehr schwach, so kann diese schlichtweg vernachlässigt werden. Das **Diffusions-Reaktionsmodell mit vernachlässigbarer lokaler Bindung** beschränkt sich dann auf die effektive Diffusion und ist damit gleich zum effektiven Diffusionsmodell, außer dass es zusätzlich die Ränder des Zellkerns als Diffusionsbarriere berücksichtigt. Im zweiten Sonderfall, dem **reaktionsdominanten Diffusions-Reaktionsmodell**, ist die effektive Diffusion (Diffusion zusammen mit der kernweiten Bindung) sehr schnell im Vergleich zur räumlich begrenzten Bindung. Somit ist die effektive Diffusion instantan, und die Fluoreszenzzunahme fast ausschließlich durch die räumlich begrenzte Bindung bestimmt. Dieser Fall ist somit fast analog zum Reaktionsbasierten einkomponentigen Modell. Er berücksichtigt jedoch die Ausdehnungen des Zellkerns und der räumlich begrenzten Bindung. Im dritten Sonderfall, dem **Diffusions-Reaktionsmodell mit lokalem Gleichgewicht**, ist auch die Bindung an die räumlich begrenzten Bindungsstellen sehr schnell im Vergleich zur kernweiten effektiven Diffusion. Folglich herrscht hier auch für die Bindung an die räumlich abgegrenzten Bindungsstellen ein lokales Gleichgewicht.

Zur Bestimmung der Mobilität von GFP, ATR-GFP, NBS1-GFP-GFP, MDC1-GFP und von 53BP1-GFP wurde in dieser Arbeit das effektive Diffusionsmodell verwendet. Die Beschreibung der selben Daten mit dem Diffusions-Reaktionsmodell mit vernachlässigbarer Bindung ergab exakt die gleichen effektiven Diffusionskonstanten. Folglich spielt in den hier beschriebenen Fällen die Diffusionsbarriere am Zellkernrand keine maßgebende Rolle. Ist das Verhältnis von Bleichfleckradius zu Zellkernradius jedoch größer, so hat dies natürlich Auswirkungen. In einem solchen Fall sollte das Diffusions-Reaktionsmodell mit vernachlässigbarer Bindung bevorzugt werden.

Die hier gezeigten Messungen konnten in keinem Fall gut mit dem einkomponentigen Reaktionsmodell beschrieben werden. Insbesondere für den schnelleren Anstieg der Kurven von NBS1 und ATR zeigten sich sehr starke Abweichungen. Aber auch für die langsamer ansteigenden Kurven reichte dieses Modell nicht aus. Wie fälschlicherweise manchmal angenommen, bedeutet eine langsame Fluoreszenzzunahme oder ein kleiner Bleichfleck nicht automatisch, dass die Diffusion vernachlässigt werden kann (Sprague et al., 2004, 2006; Mueller et al., 2008; Lambert, 2009). Auch sehr langsame FRAP-Kurven mit sehr niedrigen k_{off} Werten können Diffusionsabhängigkeit zeigen (Sprague und McNally, 2005). Wie Mueller et al. (2008, 2010) zeigten, kann eine fälschliche Vernachlässigung der Diffusion starke Auswirkungen auf die bestimmten Bindungseigenschaften haben. Sie konnten FRAP-Kurven, tatsächlich bedingt durch Diffusion und eine zusätzliche Bindung, immer gut mit dem zweikomponentigen Reaktionsmodell fitten. Dies konnte für Kurven mit Werten für k_{on}^* und k_{off} , die eine Spanne von über acht Größenordnungen aufwiesen, gezeigt werden. Das zweikomponentige Modell hat zur Folge, dass anstatt einer, zwei Bindungszustände ermittelt werden, und sich somit komplett verschiedene Interpretationen der Ergebnisse ergeben. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass mit dem zweikomponentigen Reaktionsmodell fast alle Kurven gut gefittet werden konnten. Dies liegt an der hohen Variabilität des Fits. Durch die vier freien Fitparameter lassen sich sehr viele FRAP-Kurven beschreiben. Aufgrund dieser Problematiken wurde in dieser Arbeit auf die Interpretation der Fitergebnisse mit dem zweikomponentigen Reaktionsmodell weitgehend verzichtet. Das zweikomponentige Reaktionsmodell sollte generell nur für Fälle angewandt werden, in denen die Diffusionsabhängigkeit ausgeschlossen werden kann.

In allen Modellen, die die Diffusionsprozesse beinhalten, müssen Annahmen zur Form des Bleichflecks getroffen werden. In den hier verwendeten Modellen wird immer ein kreisförmiges Bleichfleckprofil angenommen. Wie Mueller et al. (2008) zeigten, kann dies das Fitergebnis für die Bin-

dungskonstanten jedoch stark beeinflussen, da bei den falschen k_{on}^* und k_{off} Werten ein globales Fitminimum entstehen kann. Durch die realistischere Annahme eines gaussförmigen Bleichfleckprofils erhielten sie um Größenordnungen verschiedene Ergebnisse. Sie schlussfolgerten aus ihren Untersuchungen, dass diese Unterschiede jedoch nicht durch die Struktur des Bleichfleckprofils, sondern durch einen zu klein angenommenen Radius des kreisförmigen Bleichflecks hervorgerufen wurden. Nach ihren Schlussfolgerungen ist es deshalb entscheidend, eine Bleichfleckgröße anzunehmen, die der gebleichten Proteinmenge entspricht.

Im Folgenden werden einige weitere, für diese Arbeit relevante Aspekte und Einschränkungen des Diffusions-Reaktionsmodells aufgegriffen.

In den Diffusions-Reaktionsmodellen nach [Sprague et al. \(2006\)](#) werden die Größe des Zellkerns und die konzentrierte Lokalisation der Bindungsstellen modelliert. Die hier untersuchten Bindungsstellen sind in einem kleinen Bereich innerhalb des Zellkerns lokalisiert. Durch die Akkumulation der Proteine an dieser Stelle bilden sich Foci. In dem Modell wird angenommen, dass die Bleichfleckfläche der Focifläche entspricht. Es ist somit entscheidend, dass der tatsächliche gaussförmige Bleichfleck mindestens so groß ist, dass er den kompletten Fokus bleicht. Das war in dieser Arbeit bei allen Experimenten der Fall.

Aus den Diffusionsmessungen für reines GFP im Zellkern wird dessen Diffusionskonstante bestimmt. Aus den Masseverhältnissen zwischen reinem GFP und dem untersuchten GFP-markierten Protein wird, bei angenommener sphärischer Form, das Volumenverhältnis abgeschätzt und daraus die erwartete freie Diffusion des zu untersuchenden Proteins bestimmt. Aus der so abgeschätzten reinen Diffusion des Proteins und der experimentell bestimmten effektiven Diffusion wird das transiente Bindeverhalten des Proteins im gesamten Zellkern bestimmt. Zeigen die Proteine abweichende Formen oder spielen andere Effekte, wie in den Abschnitten [4.1.1](#) und [4.1.2](#) diskutiert, eine Rolle, so kann dies die Abschätzungen beeinflussen.

Aus praktischen Gründen wurde für diese Untersuchungen die zweidimensionale Variante des Diffusions-Reaktionsmodells gewählt ([Sprague et al., 2006](#)). Unterschiede zwischen den zwei- und dreidimensionalen Modellen werden bedingt durch: Transversal konisch verlaufende Bleichgeometrien, insbesondere bei der Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur, durch das Eindringen ungebleichter Proteine in den analysierten Bleichfleck aus anderen Fokusebenen und durch die Ausdehnung des Fokus in transversaler Richtung ([Sprague et al., 2006](#)).

Im Modell wird angenommen, dass sich der gebleichte kreisförmige Fokus in der Mitte eines kreisförmigen Zellkerns befindet. In den hier vorgestellten Experimenten bilden sich jedoch nach der Ionenbestrahlung mehrere Foci entlang der Trajektorien. Dies ist vorteilhaft, um die strahlungsinduzierten Foci von strahlungsunabhängigen zu unterscheiden. Allerdings ergeben sich dadurch Diskrepanzen zum Modell. Die Proteinbindung in weiteren Foci kann die Mobilität außerhalb der Foci und den Austausch im gebleichten Fokus beeinflussen. Um den Einfluss dieser Fehlerquellen zu minimieren wäre eine Untersuchung nach senkrechter Bestrahlung mit einem Ion in der Mitte des Zellkerns am besten.

Das Diffusions-Reaktionsmodell beinhaltet außerdem die Annahme, dass alle Proteine innerhalb des Bleichflecks vollständig gebleicht werden. Aus den Fits wird der Anteil der effektiv diffundierenden Proteinmenge $F_{eq,1eff}$ und der gebundenen Proteinmenge C_{2eq} bestimmt. Dies ist in der Praxis jedoch fast nie der Fall. Wird bei unvollständigem Bleichen der gleiche Anteil von $F_{eq,1eff}$ und C_{2eq} gebleicht, so ändert dies das Resultat nicht. Sind die Anteile jedoch verschieden, so hat auch dies Einfluss auf die Ergebnisse.

Zur Bestimmung des globalen Minimums des Fits wurden die Fitstartwerte für k_{2on}^* und k_{2off} über 12 Größenordnungen permutierend variiert. Lassen sich keine konkreten Werte für k_{2on}^* und

k_{2off} bestimmen, sondern nur deren Verhältnis, so deutet das nach [Sprague et al. \(2006\)](#) auf die vereinfachte Variante des Diffusions-Reaktionsmodells mit lokalem Gleichgewicht in der räumlich begrenzten Bindung hin. Dies traf auf keinen der hier untersuchten Fälle zu. [Sprague et al. \(2006\)](#) geben außerdem Konsistenzprüfungen an, um zu bestimmen, ob die vereinfachten Fälle des Diffusions-Reaktionsmodells mit Reaktionsdominanz oder lokalem Gleichgewicht vorliegen. Hierbei wird ermittelt, ob die bestimmten Bindungsparameter in den Domänen der verschiedenen Modellvarianten liegen. Diese Konsistenzprüfungen wurden in dieser Arbeit in allen Fällen durchgeführt. Für alle gemessenen Kurven lagen sie entweder in der Domäne des nicht vereinfachten Diffusions-Reaktionsmodells, oder direkt am Übergang zum reaktionsdominierten Diffusions-Reaktionsmodell. Da sich diese Grenzen jedoch, abhängig von D_{1eff} und R_0 , leicht verschieben können und die reaktionsdominierte Variante keine guten Fitergebnisse lieferte, wurde in allen Fällen das Verhalten nach dem nicht vereinfachten Diffusions-Reaktionsmodell bestimmt.

Es ist zu erwähnen, dass ein gutes Fitergebnis nie garantiert, dass das gewählte Modell und die bestimmten Parameter korrekt sind. Dies wurde am Beispiel des zweikomponentigen Reaktionsbasierten Modells zuvor diskutiert. Ein zu vereinfachtes Modell kann, wie für das einkomponentige Reaktionsbasierte Modell ersichtlich, die Daten meist nicht beschreiben. Folglich sollte ein möglichst realitätsbezogenes Modell mit möglichst wenigen Fitparametern gewählt werden. Im Rahmen dieser Arbeit war dies mit dem Diffusions-Reaktionsmodell nach [Sprague et al. \(2006\)](#), durch die Beschreibung der kernweiten Diffusion mit transienter Bindung und zusätzlicher lokalisierter fester Bindung in den meisten Fällen möglich. Hierbei gibt es lediglich zwei frei Parameter, nämlich k_{2on}^* und k_{2off} .

Zahlreiche andere FRAP-Modelle wurden publiziert. Zusätzlich zu den diskutierten Variationen in Einbeziehung bzw. Vernachlässigung der Diffusion und in der Anzahl der modellierten Bindungsarten und Kompartimente beschreiben die Modelle oft andere Bleichmuster (z.B. [Dundr et al., 2002](#); [Carrero et al., 2003](#); [Phair et al., 2004b](#); [Houtsmuller, 2005](#); [Hinow et al., 2006](#); [Beaudouin et al., 2006](#); [van Royen et al., 2009](#); [Tsibidis, 2009](#)). Um die hier beschriebenen lokalisierten Bindungen zu untersuchen, sind die meisten Modelle jedoch ungeeignet.

Experimentelle Einschränkungen

Durch die erfolgte Doppelnormierung können unerwünschte Effekte, wie der Fluoreszenzsignalverlust durch die Bildaufnahme oder Schwankungen in der Intensität des Anregungslichts kompensiert werden. Dies setzt allerdings voraus, dass sich die Variationen im Signal für den gesamten Zellkern und in den hellen Foci gleich verhalten. Bei sehr schwachem Signal sind die Messdaten von starkem Rauschen überlagert, und die Bestimmung des Nullwertsignals kann problematisch sein. Außerdem können sich die Zellen während langen Messungen bewegen. Dies kann mit Hilfe von entsprechender Bildbearbeitung teilweise kompensiert werden. Dennoch erhöht es die Variabilität der Messungen. Derartige Streuungen der experimentellen Ergebnisse lassen sich durch statistische Mittelung verringern. Zusätzlich zur biologischen Variabilität wie z.B. Zellkerngröße, Morphologie des Zellkerns, Chromatinstruktur etc. kommen, wie am Beispiel von 53BP1 später näher diskutiert wird, Unterschiede im Expressionslevel der transfizierten GFP-Proteine. Da die Gesamtproteinmenge das Ergebnis beeinflussen kann, ist unter diesen Bedingungen die Mittelung über viele Zellen problematisch. Die Menge an gebundenem Protein variiert auch mit der Focianzahl in der Zelle. Auch dadurch kann sich die Mobilität der Proteine im gesamten Zellkern verändern.

Experimentelle Bedingungen, bei denen sich einige der hier diskutierten Fehlerquellen ausschließen ließen, wären die folgenden: Eine einzelne Zelle wird gewählt, bei der das Expressionslevel

anhand des Gesamtfluoreszenzsignals bestimmt wird. Durch eine kurze FRAP-Messung wird die Mobilität der Proteine in der unbestrahlten Zelle gemessen. Daraufhin wird die Zelle mit einem einzelnen, in der Mitte platzierten Ion senkrecht bestrahlt. Die Fluoreszenzzunahme im entstehenden Fokus und die Fluoreszenzabnahme außerhalb des Fokus werden gemessen. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustands wird eine FRAP-Messung des Fokus und eine außerhalb des Fokus durchgeführt. Auf derartige Weise könnte die Mobilität in einer einzelnen Zelle umfassend modelliert werden. Analysen zur Abhängigkeit der Ergebnisse von der Gesamtproteinmenge könnten weitere Erkenntnisse liefern. Prinzipiell geeignet für solche Messungen ist der, auch in dieser Arbeit kurz beschriebene, Microbeam Aufbau der GSI. Erste Schritte in diese Richtung wurden bereits unternommen ([Merk et al., 2010](#)).

4.3 Dynamisches Verhalten der Reparaturproteine nach DNA-Schadensinduktion

4.3.1 Dynamisches Verhalten von NBS1 und MDC1 nach DNA-Schadensinduktion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Bindeverhalten von MDC1 und NBS1 in strahleninduzierten Foci untersucht. Um die Ergebnisse interpretieren zu können, wird zunächst der Prozess der NBS1 und MDC1 Bindung am DSB kurz vorgestellt. Anschließend werden die Ergebnisse zur Akkumulationskinetik und zum Bindeverhalten der Proteine am DNA-Schaden diskutiert.

Aktueller Kenntnisstand zum Binden von NBS1 und MDC1 an DNA-Schäden

Die im Folgenden beschriebenen Zusammenhänge sind zur Verdeutlichung in Abbildung 4.2 gezeigt. Konstitutiv, also strahlungsunabhängig, wird MDC1 von CK2 an mehreren Stellen der SDT-Domäne phosphoryliert. Mit dieser Struktur bindet das MDC1 über die FHA-Domäne des NBS1 an den MRN-Komplex ([Chapman und Jackson, 2008](#); [Melander et al., 2008](#); [Spycher et al., 2008](#); [Wu et al., 2008](#)). Der MRN-Komplex erkennt den DSB und bindet dort. Anschließend rekrutiert der MRN-Komplex ATM an den DSB und aktiviert es auf noch unbekannte Weise ([Bhatti et al., 2011](#)). Bei dieser Aktivierung autophosphoryliert sich ATM selbst und aus den Dimeren bilden sich Monomere. Das aktivierte ATM phosphoryliert das umliegende H2AX. Diese phosphorylierte Form von H2AX wird als γ H2AX bezeichnet. MDC1 bindet an das γ H2AX. So bindet auch der MRN-Komplex, durch die zuvor beschriebene Interaktion mit MDC1, an das Chromatin um den DSB. An NBS1 im MDC1-MRN-Komplex kann wiederum ATM binden, das weiteres umliegendes H2AX phosphoryliert. Der MRN Komplex und ATM können in diesem mehrstufigen Prozess folglich direkt am DSB und am umliegenden Chromatin binden, während MDC1 nur am umliegenden Chromatin bindet ([Bekker-Jensen et al., 2006](#); [Spycher et al., 2008](#)).

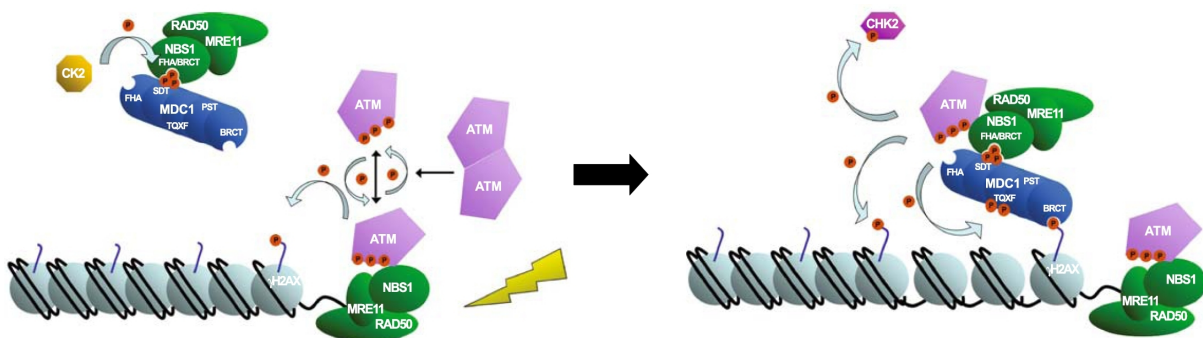


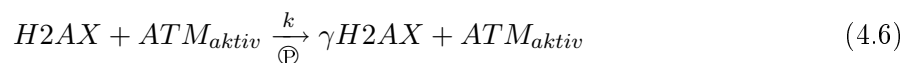
Abbildung 4.2: MRN- und MDC1-Focibildung am DSB. CK2 phosphoryliert MDC1 konstitutiv, wodurch MDC1 mit NBS1 strahlungsunabhängig interagieren können. Direkt an den DSB bindet der MRN-Komplex, wodurch ATM aktiviert wird, sich autophosphoryliert und von der inaktiven dimeren Form in die aktive monomere Form übergeht. Das aktivierte ATM phosphoryliert das umliegende H2AX zu γ H2AX. MDC1 bindet das γ H2AX, wodurch auch der MRN-Komplex über MDC1 an das umliegende Chromatin bindet. Durch die Interaktion von NBS1 mit ATM kann zusätzliches ATM rekrutiert werden, das weiteres umliegendes H2AX phosphoryliert (Abbildung modifiziert übernommen von [Jungmichel und Stucki, 2010](#)).

Akkumulation von NBS1 und MDC1 an DNA-Schäden

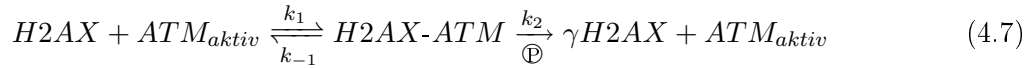
In dieser Arbeit wurde die Akkumulation der Proteine NBS1 und MDC1 an DNA-Schäden nach Bestrahlung mit Schwerionen untersucht. Da ATM über die Interaktion mit NBS1 am DSB bindet (Falck et al., 2005; Lee und Paull, 2005), wurde auch dessen Akkumulationskinetik bestimmt. Konsistent mit dieser Modellvorstellung wurde im Rahmen dieser Arbeit für ATM eine ähnlich schnelle Rekrutierung gemessen wie für NBS1 und MDC1 (Kozlov et al., 2011). Untersuchungen zu einer möglichen LET-Abhängigkeit wurden für ATM allerdings nicht durchgeführt. Für MDC1 und NBS1 zeigte sich, dass mit zunehmender Schadensdichte (zunehmendem LET) die Rekrutierung schneller wird. Die Zeitkonstante (63 %-Wert) für NBS1 und MDC1 nach C-Ionenbestrahlung nahm für beide Proteine einen ähnlichen Wert von ca. 240 s an. Mit zunehmender Schadensdichte nahm die Zeitkonstante ab und ging für MDC1 und NBS1 wieder bei sehr ähnlichen Werten von ca. 100 s in Sättigung. Die Analogie im Rekrutierungsverhalten unterstützt die beschriebene Theorie, dass beide Proteine in einem Komplex gemeinsam rekrutiert werden können.

Lukas et al. (2004) publizierten Daten zur NBS1 und MDC1 Rekrutierung, allerdings nach lokaler UV-Laserbestrahlung. Die biologisch relevante lokale Dosis lässt sich bei derartiger Bestrahlung nur schwierig bestimmen (Splinter et al., 2010). Insofern ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Die von Lukas et al. (2004) bestimmten Zeitkonstanten für NBS1 und MDC1 liegen bei 177 ± 41 s bzw. 195 ± 20 s. Sie stimmen also sehr gut mit dem hier bestimmten LET-abhängigen Bereich für beide Proteine von ca. 100 bis 240 s überein. Ähnliche und ebenfalls konsistente Messungen publizierten Bekker-Jensen et al. (2005) für MDC1. Rogakou et al. (1998) charakterisierten die zeitliche Entstehung von γ H2AX. Bis eine Minute nach Bestrahlung waren 50 % der H2AX phosphoryliert und nach 10 min war das Maximum erreicht. Diese Werte befinden sich in der Größenordnung der hier beschriebenen MDC1 Rekrutierung. In einer kürzlich erschienenen Publikation beschrieben Mosconi et al. (2011) die zeitliche Bildung von MDC1 Foci nach Bestrahlung mit Protonen und α -Teilchen mit einem LET von 15 bzw. $75 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$. Die ermittelten Zeitkonstanten betrugen ca. 320 s nach Protonen- und ca. 75 s nach α -Bestrahlung. Da der LET für diese Protonen- und α -Bestrahlung deutlich kleiner ist als der nach C-Ionenbestrahlung wäre nach den hier vorgestellten Ergebnissen in beiden Fällen eine Zeitkonstante von ca. 240 s oder größer zu erwarten gewesen. Insofern sind die Daten von Mosconi et al. (2011) nach Protonen-Bestrahlung konsistent mit den hier vorgestellten, die nach α -Bestrahlung weichen aber deutlich von den hier vorgestellten Ergebnissen ab. Die von Mosconi et al. (2011) bestimmte schnellere MDC1-Rekrutierung bei Bestrahlung mit α -Teilchen stimmt mit der hier berichteten schnelleren Rekrutierung bei sehr hohem LET überein.

Doch was sind die Ursachen für die beschleunigte MDC1- und NBS1-Rekrutierung mit steigendem LET? MDC1 bindet an das gebildete γ H2AX um den DSB und NBS1 wird über die Interaktion mit MDC1 an die gleichen Strukturen rekrutiert. Da H2AX ein Histon ist und damit relativ fest im Chromatin gebunden ist, ist dessen Konzentration um den DSB vorgegeben. H2AX wird im Gegensatz zu anderen Proteinen folglich nicht an den Schaden rekrutiert, sondern nur von H2AX zu γ H2AX phosphoryliert. Eine größere Menge an aktiviertem ATM würde also direkt zu einer beschleunigten Phosphorylierung des umliegenden H2AX zu γ H2AX führen. Um diesen Aspekt noch etwas genauer zu beleuchten, wurde folgendes Minimalmodell für die chemische Reaktion der H2AX-Phosphorylierung angenommen:



Aktives ATM wird dabei nicht verbraucht, sondern es wirkt als Katalysator für das Anhängen einer Phosphatgruppe \textcircled{P} an H2AX. Der zeitliche Verlauf der γH2AX -Konzentration ist nach dieser Reaktion gegeben durch $[\gamma\text{H2AX}](t) = 1 - e^{-[\text{ATM}_{\text{aktiv}}] \cdot k \cdot t}$. Es ist direkt ersichtlich, dass mit steigender ATM-Konzentration die Reaktion schneller abläuft. Ähnliche Ergebnisse erhält man, wenn man für den Schritt der H2AX-Phosphorylierung den in der Biochemie oft verwendeten Enzymreaktionsmechanismus nach [Michaelis und Menten \(1913\)](#) mit folgenden Gleichungen verwendet:



Hierbei wird in einer Zwischenstufe ein Komplex aus H2AX und ATM (H2AX-ATM) gebildet. Auch in diesem Fall läuft mit steigender ATM-Konzentration die Reaktion schneller ab. Die beschleunigte γH2AX -Bildung nach diesen beiden Mechanismen ist an zwei hypothetischen Beispielen mit unterschiedlichen Katalysatormengen (ATM) in [Abbildung 4.3](#) gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass für beide Modelle eine vermehrte Katalysatormenge (hier ATM), eine schnellere Produktbildung (hier γH2AX) bewirkt. In den experimentell bestimmten NBS1- und MDC1-Rekrutierungskurven konnte außerdem beobachtet werden, dass sich der Kurvenverlauf mit steigendem LET stärker krümmt. Wie in [Abbildung 4.3](#) ersichtlich, ist auch dieses Ergebnis konsistent mit dem Modell.

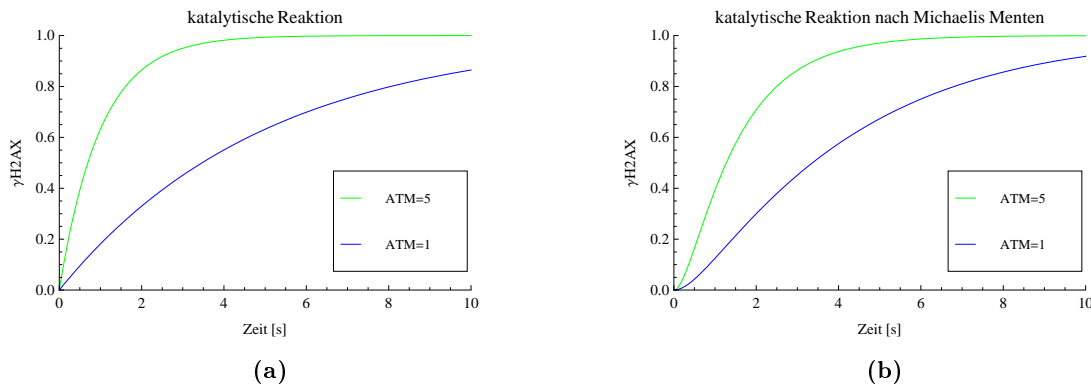


Abbildung 4.3: Abhängigkeit der Produktbildung (γH2AX) von der Katalysatormenge (ATM), verdeutlicht an zwei hypothetischen Beispielen. Im grün gezeigten Fall steht fünfmal mehr Katalysator zur Verfügung als im blau gezeigten Fall. (a): Reaktionsmechanismus nach Gleichung 4.6. (Parameter: $k=0,2 \frac{1}{s}$, Startwert von H2AX gleich 1, Startwert von γH2AX gleich 0, Wert für ATM gleich 1 bzw. 5) (b): Reaktionsmechanismus nach Gleichung 4.7. (Parameter: $k_1=0,5 \frac{1}{s}$; $k_{-1}=0,5 \frac{1}{s}$; $k_2=1 \frac{1}{s}$, Startwerte für H2AX-ATM und γH2AX gleich 0, Startwert von H2AX gleich 1, Startwert von ATM gleich 1 bzw. 5)

Bei Inhibition der CK2-Kinase wird die Interaktion zwischen NBS1 und MDC1 unterbunden. NBS1 kann also nicht mehr über MDC1 an das Chromatin um den Schaden rekrutiert werden. Die experimentellen Ergebnisse zeigten aber, dass NBS1 trotz CK2-Inhibition noch Foci bildet. Allerdings veränderte sich die Struktur der Foci. Sie waren in der Fläche weniger ausgedehnt. Sehr kleine NBS1-Foci waren aber weiterhin in den strukturell unveränderten MDC1 Foci zu sehen. Entsprechende Ergebnisse wurden bereits für Lasermikrobestrahlung publiziert ([Lukas et al., 2004](#); [Chapman and Jackson, 2008](#)). Durch die unterbundene NBS1-MDC1 Interaktion bindet NBS1 wahrscheinlich nur noch direkt am DSB und nicht mehr über MDC1 an das umliegende

Chromatin (Bekker-Jensen et al., 2006). Wie diese und publizierte Daten zeigen tritt NBS1 als zwei Fraktionen, als größere Makrofoci und als kleine Mikrofoci am DSB auf (Lukas et al., 2004). In den FRAP-Messungen wurden die Bindungseigenschaften von NBS1 näher analysiert.

Bindeverhalten von NBS1 an DNA-Schäden

Das Bindeverhalten von NBS1 in strahleninduzierten Foci ließ sich mit dem Diffusions-Reaktionsmodell sehr gut beschreiben. Die Fits passten sich sehr gut in die Daten ein, alle anderen Modelle scheiterten hingegen. NBS1 zeigt in den Foci folglich Diffusions-Reaktionsverhalten. Aus den Fits konnten die Konstanten k_{2on}^* und k_{2off} für die Bindung an die zusätzlichen strahlungsbedingten Bindungsstellen (als S_2 bezeichnet) in den Foci bestimmt werden. Es zeigte sich, dass sich beide Konstanten mit steigendem LET verkleinerten. Im Falle von k_{2on}^* ist zu bedenken, dass es sich hierbei nicht um die tatsächliche Bindungskonstante k_{2on} handelt, sondern um das Produkt aus k_{2on} und der Anzahl an freien Bindungsstellen im Gleichgewicht (S_{2eq}). Da mit steigendem LET mehr Schaden induziert wird, ist es naheliegend anzunehmen, dass auch mehr initiale Bindungsstellen generiert werden. Mit steigender Anzahl an initialen Bindungsstellen erhöht sich auch die Gleichgewichtskonzentration der freien Bindungsstellen S_{2eq} . Dies hätte zur Folge, dass k_{2on}^* mit steigendem LET größer werden sollte. Da das experimentell bestimmte k_{2on}^* aber fällt, kann dies nicht der Grund für die LET-Abhängigkeit von k_{2on}^* sein. Folglich müssen andere Effekte dominieren. Die Ursache für die LET-abhängigen k_{2on}^* Werte könnte sein, dass NBS1 in den Foci, wie zuvor beschrieben, auf zwei verschiedene Arten binden kann, nämlich direkt am DSB und über MDC1 an das umliegende Chromatin. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung bestärkt, dass sich auch k_{2off} schadensdichteabhängig veränderte. Bei nur einer Art der NBS1-Bindung dürfte sich k_{2off} nicht ändern. Folglich ist anzunehmen, dass das Diffusions-Reaktionsmodell, das eigentlich nur eine zusätzliche Bindung in den Foci annimmt, in diesem Fall tatsächlich zwei Bindungsarten beschreibt. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden weitere Analysen durchgeführt. Die relative Fociintensität wurde experimentell ermittelt, und das Ergebnis als Konstante in den Fit mit dem Diffusions-Reaktionsmodell eingegeben. In diesem Fall konnte das Modell allerdings die experimentellen Kurven nur sehr schlecht beschreiben. In weiteren Analysen wurden die gleichen experimentellen FRAP-Kurven in voller und verkürzter Länge gefittet. Es zeigte sich, dass die ermittelten Werte für k_{2on}^* und k_{2off} mit abnehmender Messdatenlänge systematisch anstiegen. Diese beiden Ergebnisse verdeutlichen, dass für NBS1 zwei Bindungsarten in den Foci vorliegen, es dem Diffusions-Reaktionsmodell dennoch gelingt die Daten gut zu beschreiben, obwohl dem Modell nur eine Bindung in den Foci zugrunde liegt. Die festere der beiden Bindungen, die einen langsameren Austausch zeigte, gewinnt mit zunehmender Datenlänge an Bedeutung. Die Bindung mit dem schnelleren Austausch wird im Diffusions-Reaktionsmodell dadurch kompensiert, dass der Anteil an $F_{eq,1eff}$ größer abgeschätzt wird, als er tatsächlich ist.

Zusätzlich zur Reduktion der Bindungskonstanten mit steigendem LET zeigte sich in den FRAP Messungen bei moderatem LET ($1550 \frac{keV}{\mu m}$), dass auch durch CK2-Inhibition die Bindungskonstanten deutlich reduziert wurden. Sie nahmen dann ähnliche Werte an, wie nach Bestrahlung mit sehr hohem LET ($> 8000 \frac{keV}{\mu m}$) aber ohne Inhibitor. Da die CK2-Inhibition das Binden von NBS1 über MDC1 an das γ H2AX markierte Chromatin um den DSB verhindert, spiegeln die mit CK2-Inhibition bestimmten Bindungskonstanten das Binden von NBS1 in den Mikrofoci, also direkt am DSB wider. Bei Inhibition der MDC1-abhängigen NBS1 Bindung wird auch die Gesamtmenge an NBS1, die in den Foci gebunden ist, reduziert. In den FRAP Ergebnissen ist dies an dem verringerten Werten für C_{2eq} zu erkennen.

Die nach CK2-Inhibition bestimmten Bindungskonstanten beschreiben folglich im Wesentlichen

die direkte Bindung von NBS1 am DSB. Mit steigendem LET näherten sich die Bindungskonstanten ohne Inhibition immer mehr den Werten mit Inhibition an. Folglich ist anzunehmen, dass die direkte Bindung mit steigendem LET an Bedeutung gewinnt. Da mit steigendem LET die erzeugte Schadensdichte anwächst, nimmt vermutlich die Anzahl der direkten Bindungsstellen für NBS1 zu. Die indirekte Bindung über MDC1 am umliegenden Chromatin hat ein anderes mechanistisches Verhalten. Die Menge an H2AX im umliegenden Chromatin ist vorgegeben. Im Gegensatz zur Proteinrekrutierung nimmt die Menge an H2AX in den Foci folglich nicht zu, sondern H2AX wird lediglich zu γ H2AX phosphoryliert. Wird bereits bei niedriger Schadensdichte alles H2AX im Fokus phosphoryliert, so kann bei einem hohen LET die Menge an gebundenem NBS1 nicht weiter steigen. Nach Röntgenbestrahlung wird mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer Domäne nur ein einzelner DSB erzeugt. Der Anteil an NBS1, der direkt an den Schaden bindet, ist folglich vergleichsweise gering. Die mit Röntgenbestrahlung ermittelten Bindungskonstanten beschreiben deshalb im Wesentlichen die indirekte Bindung am umliegenden Chromatin. Bei sehr hoher Schadensdichte und insbesondere nach CK2-Inhibition überwiegt der Anteil der direkten Bindung an den Schaden. Folglich können die Konstanten für die Bindung ans Chromatin mit Röntgenbestrahlung und die für die direkte Bindung an den Schaden mit CK2-Inhibition abgeschätzt werden. Hiermit ergibt sich aus den experimentell bestimmten Werten, dass die direkte Bindung an den Schaden durch deutlich kleinere Bindungskonstanten (k_{2on}^* und k_{2off}) beschrieben wird als die Bindung über MDC1 am umliegenden Chromatin. Die Werte ergeben einen schnelleren Austausch für die Bindung ans Chromatin. Aus diesem Grund ließen sich nur die Messungen nach Röntgen- und C-Ionenbestrahlung gut mit dem vereinfachten Diffusions-Reaktionsmodell fitten, bei dem ein lokales Gleichgewicht an den Bindungsstellen in den Foci angenommen wird. Diese vereinfachte Modellvariante führt nämlich nur dann zu einem erfolgreichen Fit, wenn der Austausch an den Bindungsstellen vergleichsweise schnell erfolgt.

Aus der positiven Korrelation zwischen der NBS1-Rekrutierungsgeschwindigkeit und dem LET wurde zuvor geschlussfolgert, dass mit steigendem LET mehr ATM aktiviert wird. Genau dies könnte die Folge einer vermehrten NBS1 Bindung direkt am Schaden sein. Eine größere Menge direkt am Schaden gebundenes NBS1 aktiviert mehr ATM und die γ H2AX-Bildung im umliegenden Chromatin läuft, wie zuvor beschrieben, schneller ab.

Da sich das System bei den FRAP-Messungen im Gleichgewicht befindet, verändert sich die Anzahl der freien Bindungsstellen in den Foci über die Dauer des Experiments nicht. Nur ein Teil der Proteine wird durch das Bleichen bei den FRAP-Experimenten sozusagen unsichtbar gemacht. Bei den Rekrutierungsmessungen ist dies nicht der Fall. Da die Bindungsstellen in den Foci erst generiert und daraufhin besetzt werden, ändert sich die Anzahl der freien Bindungsstellen über die Zeit. Aus diesem Grund lassen sich die zuvor bestimmten Zeitkonstanten aus den FRAP-Messungen nicht einfach auf die Rekrutierungsmessungen übertragen.

Die FRAP-Messungen zeigten jedoch, dass bei Bestrahlung mit niedrigem LET der direkt an den Schaden bindende NBS1-Anteil gering ist. Deshalb bindet NBS1 hauptsächlich über MDC1 und beide Proteine zeigen ähnlich schnelle Rekrutierungskinetiken. Bei Bestrahlung mit sehr hohem LET ergab sich aus den FRAP-Messungen jedoch, dass die Fraktion von NBS1, die direkt an den Schaden bindet, einen maßgeblichen Anteil einnehmen muss. Nach dem beschriebenen Reaktionsmechanismus muss NBS1 zunächst direkt an den Schaden binden, bevor über die ATM-Aktivierung und H2AX-Phosphorylierung die Bindungsstellen für MDC1 im Chromatin generiert werden. Da NBS1 und MDC1 nach Bestrahlung mit hohem LET jedoch ebenfalls eine ähnlich schnelle Rekrutierung zeigten, ist anzunehmen, dass in diesem Fall die direkte Bindung von NBS1 an den Schaden den geschwindigkeitslimitierenden Schritt darstellt. Die ATM-Aktivierung, γ H2AX-Bildung und MDC1-Bindung verlaufen dann vermutlich vergleichsweise

schnell. Wie zuvor diskutiert, wird bei Bestrahlung mit niedrigerem LET weniger ATM aktiviert und die γ H2AX-Bildung stellte einen weiteren geschwindigkeitslimitierenden Schritt dar. Mit Hilfe des Microbeamaufbaus war es möglich eine gewählte Stelle innerhalb des Zellkerns mit einer definierten Anzahl an Ionen zu beschießen. Der LET der hier verwendeten N-Ionen an diesem Aufbau betrug $400 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$. Die Zellen wurden mit einem, zehn oder dreißig N-Ionen an der gewählten Stelle bestrahlt. Zehn bzw. dreißig N-Ionen deponieren die gleiche Dosis in einer Zelle wie ein einzelnes Ion mit einem LET von 4000 bzw. $12000 \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$. Die räumliche Dosisverteilung ist jedoch verschieden. Bei der Microbeambestrahlung verteilen sich die N-Ionen statistisch auf eine rechteckige Fläche von 500 nm x 700 nm. Bei der Bestrahlung mit einem einzigen Ion mit sehr hohem LET wird die Dosis, wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, sehr lokal deponiert und nimmt mit dem inversen Abstandsquadrat schnell ab. Bei der Microbeambestrahlung konnte keine Veränderung der Rekrutierungsgeschwindigkeit mit steigender Ionenanzahl gemessen werden. Die Zeitkonstante der Rekrutierung war in allen Fällen ähnlich, aber deutlich größer als nach Bestrahlung mit sehr hohem LET. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass für die beschleunigte NBS1-Rekrutierung eine sehr hohe lokale Schadensdichte nötig ist.

Zusammengefasst lässt sich folgender Mechanismus postulieren. Nach strahlungsinduzierter DNA-Schadensinduktion bindet NBS1 direkt an den Schaden. Dadurch wird ATM aktiviert. ATM phosphoryliert das umliegende H2AX zu γ H2AX. MDC1, das mit NBS1 interagiert, bindet an dieses γ H2AX. Mit steigender Schadensdichte wird mehr NBS1 direkt an den Schaden gebunden und mehr ATM aktiviert. Die Phosphorylierung des umliegenden H2AX verläuft dadurch schneller und MDC1 wird zusammen mit NBS1 schneller rekrutiert. Bei sehr hohem LET ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt vermutlich die initiale Bindung von NBS1 direkt an den Schaden. Die NBS1-Proteine, die direkt an den Schaden binden, werden fester gebunden als die NBS1-Proteine, die im umliegenden Chromatin binden. Dies spiegelt vermutlich die unterschiedlichen Funktionen von NBS1 wider. NBS1, das direkt an den Schaden bindet, stabilisiert im MRN-Komplex die DNA-Enden des DSB. Das NBS1, das im umliegenden Chromatin schwächer bindet, könnte in anderen Signalwegen der Zelle beteiligt sein. Es lässt sich spekulieren, dass die von [Virgilio et al. \(2009\)](#) beschriebene PIKK-abhängige MRE11 Phosphorylierung, die das Loslösen des MRN-Komplexes bewirkt, den schnelleren Austausch der chromatinbindenden NBS1 Fraktion bewirkt.

Bindeverhalten von MDC1 an DNA-Schäden

Um das MDC1-Bindeverhalten in strahleninduzierten Foci genauer zu beschreiben, wurden ebenfalls FRAP-Messungen durchgeführt. Konsistent mit den Daten von [Lukas et al. \(2004\)](#) wurde für MDC1 eine deutlich geringere Mobilität als für NBS1 in Foci gemessen. Das Binden von MDC1 am DNA-Schaden nach Röntgen- und C-Ionenbestrahlung konnte mit dem Diffusions-Reaktionsmodell gut beschrieben werden. Die Messung in Foci nach Au-Ionenbestrahlung wurde mit dem gleichen Modell gefittet. Hierbei ergaben sich allerdings deutliche Abweichungen zwischen dem Fit und dem Datenverlauf. Die Begründung für diese Abweichungen gaben weitere Analysen die zeigten, dass MDC1 nach Bestrahlung mit sehr hohem LET nicht nur in den Foci, also direkt um den DNA-Schaden, sondern auch im gesamten Zellkern eine verminderte Mobilität zeigte. Eine verminderte Mobilität im gesamten Zellkern könnte durch das Binden von sehr viel MDC1-Proteinen in den Foci bedingt sein, wenn dadurch die Anzahl an freien Bindungsstellen, an die MDC1 vermutlich auch strahlungsunabhängig transient bindet, maßgeblich zunimmt. Immunzytochemische Färbungen zeigten jedoch, dass γ H2AX nach Bestrahlung mit sehr hohem LET nicht nur im Chromatin um den DNA-Schaden, sondern im gesamten Zellkern gebildet

wird (siehe Abbildung 3.7). Somit bindet MDC1 kernweit an γ H2AX und die MDC1-Mobilität im gesamten Zellkern vermindert sich. Um die Hypothese zu überprüfen, dass MDC1 sowohl um den DNA-Schaden als auch kernweit an γ H2AX bindet, wurde ein weiteres FRAP Modell für die Messungen außerhalb der Foci angewandt. Dieses beschreibt analog zu dem sonst verwendeten Diffusions-Reaktionsmodell zusätzlich zum effektiven Diffusionsverhalten eine weitere feste Bindung, wobei diese zusätzlichen Bindungsstellen aber nicht auf die kleine Fläche des Fokus, sondern auf die gesamte Fläche verteilt sind. Mit diesem Modell konnte die verminderte MDC1-Mobilität im gesamten Zellkern nach Bestrahlung mit sehr hohem LET gut beschrieben werden. Die so bestimmte Bindungskonstante k_{2off} für das Binden im gesamten Zellkern war sehr ähnlich zu denen für das Binden in den Foci. Dies bedeutet, dass ein MDC1-Molekül in beiden Fällen im Mittel gleich lange gebunden bleibt, was die Vermutung bestätigt, dass es sich in beiden Fällen um die gleiche Bindung, nämlich an γ H2AX handelt.

Wie andere hier nicht beschriebene Analysen zeigten, ist der Gleichgewichtszustand der kernweiten γ H2AX-Bildung erst nach 30 bis 60 min erreicht (Meyer, 2011). Da die FRAP-Messungen ab ca. 30 min nach Bestrahlung durchgeführt wurden, spielt die Bindung von MDC1 in der gesamten Zelle hierfür eine entscheidende Rolle. Für die zuvor diskutierten Rekrutierungsmessungen ist die kernweite γ H2AX-Bildung jedoch vermutlich vernachlässigbar, da diese Messungen nur bis maximal 9 min nach Bestrahlung andauerten.

Da NBS1 über MDC1 an γ H2AX bindet, wäre auch für NBS1 eine verringerte Mobilität im gesamten Zellkern nach Bestrahlung mit sehr hohem LET zu erwarten. Allerdings war dies in den entsprechenden experimentellen Daten für NBS1 nicht ersichtlich. Wie zuvor diskutiert, war die Mobilität beider Proteine jedoch auch in unbestrahlten Zellen deutlich verschieden. Außerdem lässt sich aus den bestimmten k_{2off} Werten abschätzen, dass MDC1 für ca. 500 s an γ H2AX, NBS1 aber nur ca. 20 s an MDC1 gebunden bleibt. Diese Ergebnisse sprechen für eine sehr dynamische Interaktion von NBS1 mit MDC1. Es könnte hinzukommen, dass die NBS1-Konzentration außerhalb der Foci deutlich größer ist als die Konzentration des gebundenen MDC1 und somit nur ein geringer Anteil des NBS1 gebunden wird. Durch diese Überlegungen ließe sich erklären, warum NBS1 außerhalb der Foci auch nach Bestrahlung mit hohem LET im Gegensatz zu MDC1 keine messbare Verringerung der Mobilität zeigte.

Wie im Abschnitt zuvor im Zusammenhang mit NBS1 diskutiert, wird bei Bestrahlung mit hohem LET vermutlich mehr ATM aktiviert. Diese vermehrte ATM-Aktivierung führt offensichtlich nicht nur zu einer schnelleren γ H2AX-Bildung um den DNA-Schaden, sondern die Phosphorylierung von H2AX breitet sich über den gesamten Zellkern aus. Da MDC1 auch außerhalb der Foci an γ H2AX bindet, erscheinen die MDC1-Foci in den Fluoreszenzbildern nach Bestrahlung mit sehr hohem LET kontrastärmer als bei Bestrahlung mit niedrigerem LET. Im Umkehrschluss würde, bei Bestrahlung mit sehr hohem LET, eine verminderte Aktivität von ATM zu einer verminderten MDC1-Bindung im gesamten Zellkern und so zu kontrastreicheren Foci führen. Um dies zu überprüfen wurde durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren gegen ATM und die funktionell sehr nah verwandte Kinase DNA-PK deren Aktivierung vermindert. FRAP-Messungen außerhalb der Foci zeigten dass sich k_{2on}^* durch die Inhibition um ca. den Faktor 2 verminderte. Da es sich bei der Bindung von MDC1 innerhalb und außerhalb der Foci um die mechanistisch gleiche, nämlich die an γ H2AX handelt, ist anzunehmen, dass in beiden Fällen k_{2on} gleich ist. Mit der Beziehung $k_{2on}^* = k_{2on} \cdot S_{2eq}$ ergibt sich, dass sich durch die Inhibition die Zahl der unbesetzten Bindungsstellen außerhalb der Foci ca. halbiert. Dies ist konsistent mit der Theorie, dass durch die Inhibition weniger γ H2AX gebildet wird und somit weniger freie Bindungsstellen außerhalb der Foci vorliegen. Dadurch kann MDC1 vermehrt in den Foci binden und diese erscheinen nach Inhibition kontrastreicher. Wie im Abschnitt zuvor diskutiert, führt

Röntgenbestrahlung nicht zu einer erhöhten ATM-Aktivierung und folglich ist keine kernweite H2AX-Phosphorylierung zu beobachten. Aus diesem Grund vermindert die Doppelinhibition nach Röntgenbestrahlung die γ H2AX-Bildung direkt um den DNA Schaden, wodurch die MDC1 Foci in den Fluoreszenzbildern schwächer werden.

Analog kann aus den entsprechenden Werten für k_{2on}^* abgeschätzt werden, dass nach Alpha-Ionenbestrahlung die Konzentration der unbesetzten Bindungsstellen in den Foci, mit und ohne Doppelinhibition, mehr als 700 mal so hoch ist wie außerhalb der Foci.

Auch die kleineren Werte von k_{2on}^* nach CK2-Inhibition lassen annehmen, dass die Inhibition zu weniger Bindungsstellen führt. Wie in Abbildung 4.2 zu sehen, bindet ATM an NBS1, und so über die Interaktion von NBS1 mit MDC1 an das Chromatin. Dieser Bindemechanismus führt vermutlich dazu, dass ATM mehr H2AX um den Schaden phosphoryliert (Stucki und Jackson, 2006). Durch die CK2-Inhibition wird die Interaktion zwischen NBS1 und MDC1 unterbunden. Folglich wird weniger ATM gebunden und weniger H2AX phosphoryliert. Die Anzahl der freien Bindungsstellen für MDC1 verringert sich und folglich auch k_{2on}^* . Die starke Verringerung von k_{2off} durch die CK2-Inhibition zeigt, dass bei unterbundener NBS1-MDC1-Interaktion MDC1 im Mittel deutlich länger an γ H2AX gebunden ist, nämlich ca. 1300 s statt ca. 500 s. Dies würde bedeuten, dass die Interaktion von NBS1 mit MDC1 auf eine unbekannte mechanistische Weise das Ablösen von MDC1 von γ H2AX begünstigt. Hierbei könnten auch Phosphorylierungen von ATM, das wie beschrieben über NBS1 bindet, eine Rolle spielen.

Der biologische Wirkmechanismus ist evolutionsbedingt vermutlich auf die Reparatur von einzelnen DSB optimiert. Deshalb bindet genau so viel NBS1 direkt am DSB, dass eine ausreichende Menge an ATM aktiviert wird um das umliegende Chromatin durch die H2AX-Phosphorylierung zu markieren. Der Mechanismus, der dazu führt, dass ATM inaktiviert wird sobald es den Bereich einer typischen Focigröße verlässt, ist unbekannt. Bei Bestrahlung mit einem sehr hohen LET wird eine große Zahl an DSB auf kleinstem Raum generiert. Es bindet mehr NBS1 an die DSB und mehr ATM wird aktiviert als nötig wäre um das umliegende Chromatin zu phosphorylieren. Dies führt zu den spezifischen Effekten der hoch LET-Bestrahlung, dass zum einen das umliegende H2AX deutlich schneller, und zum anderen H2AX im gesamten Zellkern phosphoryliert wird. An das so gebildete γ H2AX im gesamten Zellkern bindet MDC1 und dessen Mobilität verringert sich im gesamten Zellkern.

4.3.2 Dynamisches Verhalten von 53BP1 nach DNA-Schadensinduktion

Aktueller Kenntnisstand zum Binden von 53BP1 an DNA-Schäden

Der genaue Mechanismus, der zur Bindung von 53BP1 in strahleninduzierten Foci führt, ist noch nicht bekannt. Er scheint sehr komplex zu sein und viele regulierende Schritte zu beinhalten (FitzGerald et al., 2009). Wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, bindet 53BP1 an methyliertes K79 des Histons H3 und an methyliertes K20 des Histons H4 (Huyen et al., 2004; Botuyan et al., 2006). Auch wenn die Ergebnisse hierzu nicht ganz eindeutig sind, nehmen diese Methylierungen durch Bestrahlung vermutlich nicht zu (Lukas et al., 2011). Da die Methylierungsstellen im Inneren der Nukleosomen liegen sind sie aber nicht direkt zugänglich. Erst durch die Chromatinrelaxation um den DNA-Schaden werden die Bindungsstellen nach außen präsentiert. Nach heutigem Kenntnisstand hängt dieser Prozess von der H2AX-Phosphorylierung und der MDC1-Bindung ab. Dadurch können Ubiquitinligasen binden, die dann umliegende Histone ubiquitinieren. Durch einen noch unbekannten Mechanismus führt diese Ubiquitinierung schließlich zum

Binden von 53BP1 ([Huen et al., 2007](#); [Kolas et al., 2007](#); [Mailand et al., 2007](#)). 53BP1 bindet folglich nur am Chromatin in der Umgebung des DNA-Schadens und nicht direkt am Schaden ([Bekker-Jensen et al., 2006](#)).

Akkumulation von 53BP1 an DNA-Schäden

Bis zur 53BP1 Bindung sind sicher mehr Reaktionsschritte nötig als bis zur NBS1- oder MDC1 Bindung. Dies wird durch die hier gezeigten Rekrutierungsmessungen von 53BP1 bestätigt. Die Kurven erreichten im Vergleich zu den NBS1- und MDC1-Messungen deutlich später das Gleichgewichtsplateau. Außerdem zeigten die Kurven eine Verzögerungsphase nach der Bestrahlung und einen stark sigmoiden Verlauf. Ähnliche Ergebnisse erhielten [Lukas et al. \(2005\)](#) nach UV-Laserbestrahlung und [Mosconi et al. \(2011\)](#) nach α - und Protonenbestrahlung. Somit bestätigen die hier gezeigten Ergebnisse das Modell, dass nach der DNA-Schadensinduktion zunächst einige Vorprozessierungsschritte ablaufen müssen, um die Bindungsstellen von 53BP1 zu generieren. Die 53BP1-Rekrutierungskinetiken zeigten in den hier vorgestellten Ergebnissen keine deutlichen Unterschiede nach C- und Au-Ionenbestrahlung. Da 53BP1 jedoch MDC1-abhängig rekrutiert wird und MDC1 eine deutliche LET-Abhängigkeit zeigte, müssen die anschließenden Schritte der Chromatinkondensation geschwindigkeitsbestimmend und LET-unabhängig sein.

Bindeverhalten von 53BP1 an DNA-Schäden

Die FRAP-Messungen in strahleninduzierten Foci zeigten, dass 53BP1 sehr fest am Chromatin um den DNA Schaden bindet. Aus den Fitergebnissen für k_{2off} lässt sich bestimmen, dass ein 53BP1-Protein für ca. 1200 ± 280 s gebunden bleibt, bis es sich wieder von der Bindungsstelle löst. Die Werte k_{2on}^* ergeben, dass nur ca. $1,1 \pm 0,2$ s vergehen bis wieder erneut ein Protein gebunden wird. Da jedoch bereits der Fit in den unbestrahlten Zellen deutliche Abweichungen zeigte, konnten die FRAP-Messungen in Foci nicht optimal mit dem Diffusions-Reaktionsmodell beschrieben werden. Außerdem zeigten alle gemessenen FRAP-Kurven in Foci, nach Ionen- und Röntgenbestrahlung, eine große Varianz. Diese korreliert jedoch nicht mit der induzierten Schadensdichte. Eine große Variabilität war auch zwischen den Messungen einzelner Zellen zu beobachten. Dies äußert sich in den großen Fehlerbalken der Kurven (siehe Abbildung 3.33). Tiefer liegende Kurven zeigten im Allgemeinen einen flacheren und weniger gekrümmten Verlauf. Dies könnte durch variable k_{2on}^* Werte bedingt sein. Dies ist zur Verdeutlichung in Abbildung 4.4a gezeigt. Alle Parameter wurden in Anlehnung an die Ergebnisse der FRAP-Messungen gewählt, nur k_{2on}^* wurde variiert. Es ist zu erkennen, dass die beschriebene Variabilität durch unterschiedliche Werte für k_{2on}^* bedingt sein könnte. Da k_{2on}^* durch das Produkt aus k_{2on} und S_{2eq} gegeben ist, könnte k_{2on}^* durch Unterschiede in der Anzahl der freien Bindungsstellen S_{2eq} variieren. Diese Vermutung und die Beobachtungen der Zell zu Zell Variabilität lassen annehmen, dass der unterschiedliche FRAP-Kurvenverlauf durch Unterschiede in der Proteinexpression bedingt wird. Dies würde bedeuten, dass die Gesamtproteinmenge limitierend ist. Untersuchungen mit Immunogoldfärbung und hoch auflösender Elektronentransmissionsmikroskopie von [Rübe et al. \(2011\)](#) zeigten, dass mit steigender Anzahl an erzeugten DSB (nach 6 MV-Photonenbestrahlung), die Anzahl der Antikörper an den einzelnen DSB abnimmt. Somit bindet bei steigender Anzahl an DSB weniger Protein pro DSB. Dies bestätigt die Vermutung der limitierenden Gesamtproteinmenge.

Um diesen Aspekt näher zu beleuchten wurde die am DNA Schaden gebundene Proteinmenge in Abhängigkeit der gesamten Proteinmenge theoretisch bestimmt. Hierzu wurden die aus den FRAP-Messungen ermittelten Werte für k_{2on}^* und k_{2off} verwendet. Der Zusammenhang ist für

eine angenommene Zahl von 100 Bindungsstellen beispielhaft in Abbildung 4.4b dargestellt. Es wird deutlich, dass durch die kleinen k_{2off} - und großen k_{2on}^* Werte alles verfügbare Protein gebunden wird bis alle Bindungsstellen besetzt sind. Mit weiteren Analysen wurde überprüft, ob sich dieser theoretische Zusammenhang experimentell bestätigen lässt. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten in der gesamten Zelle und in den Foci wurden bestimmt. Es ergab sich eine eindeutig lineare Korrelation. Folglich konnte die Vermutung, dass sehr viele Bindungsstellen für 53BP1 am DNA-Schaden generiert werden und die Gesamtproteinmenge limitierend ist bestätigt werden. Der Zusammenhang lässt sich somit wie folgt beschreiben: Je höher die Gesamtmenge an verfügbarem Protein ist, umso mehr Protein bindet in den Foci und umso geringer ist die Anzahl an freien Bindungsstellen. Dies bedingt unterschiedliche k_{2on}^* Werte, was sich wiederum in der Variabilität der FRAP-Kurven äußert. Dies könnte auch der Grund für die sehr unterschiedlichen publizierten Ergebnisse sein: Bekker-Jensen et al. (2005) bestimmten die Fluoreszenzwiederherstellung nach dem Bleichen von 53BP1 an UV-induzierten Schäden auf ca. 100 s, während Asaithamby und Chen (2009) in Foci nach γ -Bestrahlung Werte größer als 15 min erhielten. Watanabe et al. (2009) analysierten das Binden von 53BP1 an Bleomycin induzierte DSB, wobei sie nur eine sehr geringe Fluoreszenzzunahme bis 200 s nach dem Bleichen beobachteten.

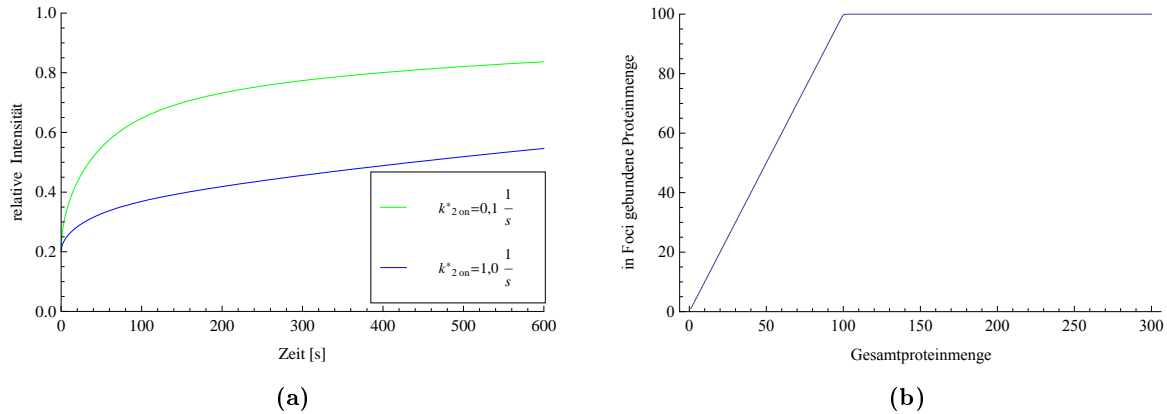


Abbildung 4.4: (a): FRAP-Kurvenverlauf nach dem Diffusions-Reaktionsmodell für verschiedene Werte für k_{2on}^* . In Anlehnung an die FRAP Ergebnisse wurden folgende Werte gewählt: $D_{eff} = 0,0125 \frac{\mu m^2}{s}$, $R_0 = 1,5 \mu m$, $R_b = 10,2 \mu m$, $\Phi = 0,8$, $m_{53BP1-GFP} = 244$ kDa, $k_{2off} = 0,00086 \frac{1}{s}$. (b): Menge des gebundenen Proteins bei unterschiedlicher Gesamtproteinmenge. Reaktionsmechanismus analog zu dem in Gleichung 3.2 gezeigten. Das Protein 53BP1 kann mit den Bindungsstellen reagieren und bindet an diese mit der Rate k_{on} . Mit Rate k_{off} löst sich das Protein wieder von den Bindungsstellen. In diesem Beispiel beträgt die Anzahl der gesamten Bindungsstellen 100. In Anlehnung an die FRAP Ergebnisse wurde für k_{on} einen Wert von $1,0 \frac{1}{s}$ und für k_{off} einen Wert von $0,0010 \frac{1}{s}$ angenommen.

Es wurde experimentell gezeigt, dass die Intensität in den Foci linear mit der Gesamtproteinmenge zunimmt. Die Linearität blieb bis zu den hellsten Zellen mit der höchsten Proteinmenge erhalten. Folglich sind selbst in den hellsten Zellen nicht alle Bindungsstellen mit 53BP1-Proteinen besetzt. Wie in den Abbildungen 3.1 und 3.10 ersichtlich, binden trotzdem nicht alle verfügbaren Proteine in den Foci. Auch außerhalb der Foci ist noch deutlich ein Fluoreszenzsignal im gesamten Zellkern (ausgenommen Nukleoli) zu erkennen. Um die Mobilität dieser Proteine zu bestimmen, wurden FRAP-Messungen außerhalb der Foci in bestrahlten Zellen durchgeführt. Es zeigten sich keine merklichen Unterschiede zu unbestrahlten Zellen. Wie zuvor beschrieben ist die 53BP1 Mobilität in unbestrahlten Zellen sehr viel geringer als nach reiner Diffusion zu erwarten wäre, was durch ein transientes Binden an feste Strukturen (Bindungsstelle S_1) bedingt sein könnte.

Da eine beachtliche Menge an Protein in den Foci bindet, nimmt die Proteinmenge außerhalb der Foci dadurch deutlich ab und die Anzahl an freien Bindungsstellen S_1 nimmt dadurch zu. In einer solchen Modellvorstellung ließe sich eine unveränderte Mobilität außerhalb der Foci, verglichen zu der in unbestrahlten Zellen, nur dadurch erklären, dass es auch dort sehr viele unbesetzte Bindungsstellen S_1 gibt. Die Menge an freien Bindungsstellen würde durch das Binden von 53BP1 in Foci dann nicht maßgeblich erhöht. Damit bleiben auch k_{on}^* und die FRAP-Kurven praktisch unverändert. Alternativ könnte 53BP1 auch in großen Komplexen anormales Diffusionsverhalten zeigen. Dies ließe sich mit den Ergebnissen von [Adams et al. \(2005\)](#) und [Zgheib et al. \(2009\)](#) vereinbaren, die zeigten, dass 53BP1 auch in unbestrahlten Zellen oligomerisiert. Auch unter diesen Bedingungen würde sich die Mobilität von 53BP1 außerhalb der Foci nicht verändern, wenn ein Teil der Proteine in den Foci bindet. Allerdings sollte in diesem Fall, nach genügend langer Zeit, alles Protein in den Foci binden, was diese Vermutung unwahrscheinlicher erscheinen lässt.

Zusammengefasst zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass einige Prozessierungsschritte um den DNA-Schaden ablaufen müssen bis 53BP1 binden kann. 53BP1 bindet dann sehr fest an das Chromatin um den DNA-Schaden. Ein einzelnes Protein bleibt ca. 20 min gebunden und bindet nach dem Ablösen wahrscheinlich sofort wieder innerhalb des Fokus, da dort sehr viele freie Bindungsstellen vorhanden sind. Der limitierende Faktor ist vermutlich die Gesamtproteinmenge. Unterschiede in der Proteinexpression von Zelle zu Zelle bewirken so die Variabilität in den FRAP-Kurven. Auch außerhalb der Foci und in unbestrahlten Zellen gibt es vermutlich sehr viele unbesetzte Bindungsstellen für 53BP1.

4.3.3 Dynamisches Verhalten von ATR nach DNA-Schadensinduktion

Aktueller Kenntnisstand zum Binden von ATR an DNA-Schäden

Nach aktuellem Kenntnisstand führen folgende Schritte zur Bindung von ATR am DNA-Schaden (siehe auch Abschnitt 1.1.2). Das durch den DSB aktivierte ATM initiiert die Aktivität von Nukleasen. Dadurch wird ein DNA-Strang am DSB resektiert und es entsteht ein ssDNA-Überhang. Dieser wird durch RPA markiert, an das wiederum ATR über ATRIP bindet.

Akkumulation von ATR an DNA-Schäden

Folglich laufen einige Vorprozessierungsschritte ab bevor ATR binden kann. Aus diesem Grund zeigt die Rekrutierungskurve zu Beginn eine Verzögerungsphase und einen sigmoiden Verlauf. Außerdem wird der Plateauwert deutlich später erreicht als im Fall von NBS1, MDC1 oder ATM. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den von [Mailand et al. \(2007\)](#) publizierten Rekrutierungskurven für ATR nach UV-Laserbestrahlung.

Da ATR nur die ssDNA direkt am DNA-Schaden und nicht am umliegenden Chromatin bindet, bildet es kleine Mikrofoci aus ([Bekker-Jensen et al., 2006](#)). Die beschriebene DNA-Resektion, die zur ATR-Bindung führt, findet nach DNA-Schadensinduktion mit locker ionisierender Strahlung nur in der S- und G2-Zellzyklusphase effizient statt ([Jazayeri et al., 2006](#); [Polo und Jackson, 2011](#)). Aus diesem Grund zeigten nach Röntgenbestrahlung nur wenige Zellen ATR-Foci. Dies ändert sich jedoch nach Schwerionenbestrahlung. Mit steigendem LET und damit steigender Schadensdichte nahm der Anteil der Zellen, die ATR-Foci bildeten, deutlich zu. Weitere, in dieser Arbeit nicht dargestellte Ergebnisse zeigten, dass auch der Anteil an Zellen mit RPA-Foci mit steigendem LET zunimmt. Die hohe induzierte Schadensdichte nach Bestrahlung mit schweren Ionen führt folglich zu einer vermehrten DNA-Enden-Prozessierung, wodurch mehr

ssDNA-Überhänge erzeugt werden. Dadurch bilden sich mehr RPA- und ATR-Foci, auch in der G1 Zellzyklusphase.

Da dies jedoch erst bei Bestrahlung mit einem sehr hohen LET zutrifft, war die Messung der Rekrutierungskinetik nach Bestrahlung mit Ionen niedrigen LET nicht möglich. Deshalb wurden keine Analysen zur Abhängigkeit der Rekrutierungsgeschwindigkeit von der Schadensdichte durchgeführt.

Bindeverhalten von ATR an DNA-Schäden

Wie zuvor beschrieben, ließen sich die Messungen der ATR-Mobilität in unbestrahlten Zellen sehr gut mit dem effektiven Diffusionsmodell beschreiben. Die Messkurven ergaben eine effektive Diffusionskonstante der ATR-Proteine von $0,50 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$, und dass ca. 9 % der ATR-Moleküle ungebunden frei diffundieren.

Die Mobilität der ATR-Proteine war in den Foci deutlich reduziert. Die Kurve der FRAP-Messung nach Au-Ionenbestrahlung verläuft zusätzlich deutlich unter der nach Cr-Ionenbestrahlung. Dies entspricht den Erwartungen, da mit steigender Schadensdichte mehr ssDNA gebildet wird und damit mehr Proteine in den Foci binden. Diese Erwartung wurde dadurch bestätigt, dass nach Au-Ionenbestrahlung der bestimmte diffundierende Anteil $F_{eq,1eff}$ kleiner ist als nach Cr-Ionenbestrahlung. Allerdings ließ sich das Binden von ATR, trotz der guten Fitergebnisse in unbestrahlten Zellen, nicht gut mit dem Diffusions-Reaktionsmodell beschreiben. Aus diesem Grund wurden die Daten erneut mit dem Diffusions-Reaktionsmodell gefittet, wobei die effektiven Diffusionskonstanten jedoch nicht festgelegt, sondern im Fit mitbestimmt wurden. Die resultierenden Fitergebnisse waren sehr gut. Die effektiven Diffusionskonstanten wurden jedoch auf deutlich kleinere Werte als in unbestrahlten Zellen bestimmt. Es gibt zwei mögliche Ansätze um dieses Verhalten zu erklären. Zum einen wäre es möglich, dass die effektiv diffundierende Proteinmenge durch die Akkumulation von ATR in Foci stark abnimmt. Dadurch nimmt die Anzahl der freien Bindungsstellen S_{1eq} , an die ATR außerhalb der Foci transient binden kann, zu. Dies würde zu einer generell verringerten Mobilität der ATR-Proteine und damit zu einer geringeren effektiven Diffusionskonstante führen. Ob dies der Fall ist, muss in weiteren zukünftigen Experimenten überprüft werden. Alternativ wäre es möglich, dass sich das Binden von ATR an DNA-Schäden nicht durch einen Mechanismus erster Ordnung an nur eine Sorte von Bindungsstellen beschreiben lässt. Dies wird im Folgenden diskutiert. Bei den Fits mit variablem D_{1eff} wurden Werte für $F_{eq,1eff}$ von 0,90 nach Cr- bzw. 0,76 nach Au-Ionenbestrahlung bestimmt. $F_{eq,1eff}$ bezeichnet den Anteil an ATR-Molekülen in den Foci, die effektives Diffusionsverhalten zeigen und nicht an die zusätzlichen Bindungsstellen S_2 im Fokus gebunden sind. Experimentell konnte jedoch bestimmt werden, dass das mittlere Fluoreszenzsignal außerhalb der Foci höchstens 56 % der Werte in den Foci annimmt. Somit wird beim Fitten der Daten mit variablem D_{1eff} ein Teil der ATR-Bindung in den Foci fälschlicherweise durch verlangsamte Diffusion beschrieben. Die Bindung von ATR in den Foci lässt sich demnach nicht durch das einfache Modell beschreiben, bei dem ATR nur an eine Art von Bindungsstellen bindet. Offensichtlich ist der ATR Bindungsmechanismus komplexer. Die von [Kumagai et al. \(2006\)](#) beschriebene direkte Interaktion von TOPBP1 mit ATR-ATRIP, wodurch die ATR-Kinaseaktivität aktiviert wird, könnte hierbei eine Rolle spielen. Außerdem schlugen [Lukas et al. \(2011\)](#) vor, dass ATR bei fehlerhafter Replikation über TOPBP1 auch an phosphoryliertes MDC1 binden kann. Sollte dieser Bindemechanismus auch bei der Reparatur der sehr dichten DNA-Schäden nach hoher LET-Bestrahlung eine Rolle spielen, so könnte dies zum komplexeren Binden von ATR in den Foci oder zu einer verringerten kernweiten Mobilität beitragen.

Zusammengefasst bestätigen die Ergebnisse, dass die Bindungsstellen für ATR in Prozessierungsschritten nach der DNA-Schadensinduktion zunächst gebildet werden müssen. Mit steigender Schadensdichte nimmt die Anzahl an Bindungsstellen zu. Das gebundene ATR zeigt einen vergleichsweise schnellen dynamischen Austausch. Jedoch kann das Binden von ATR in Foci nicht mit nur einer Sorte von Bindungsstellen und einem Mechanismus erster Ordnung beschrieben werden. Daraus lässt sich schließen, dass ATR nach Bestrahlung entweder eine kernweite verringerte Mobilität zeigt, oder einem komplizierteren Bindungsmechanismus am DNA-Schaden unterliegt.

4.4 Der experimentelle Aufbau zur FRET-Detektion mittels Fluoreszenzpolarisationsanisotropie

Um FRET-Messungen mittels Fluoreszenzpolarisationsanisotropie an dem vorhandenen Mikroskopaufbau zu ermöglichen, waren im Wesentlichen zwei Modifikationen nötig. Das Anregungslicht musste linear polarisiert und die beiden Polarisationsrichtungen des Emissionslichts mussten separat detektierbar gemacht werden. Die optimale Position für die Anbringung eines Polarisators im Anregungsstrahlengang wurde ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass bei Anbringung des Polarisators vor der ersten Spinning-Disk das Anregungslicht linear polarisiert am Probenfleck ankommt. Das polarisierte Anregungslicht und das mit Kamera 1 detektierte Licht besaßen die gleiche Ausrichtung (Polarisation: p). Die senkrecht dazu ausgerichtete Polarisation (Polarisation: s) wurde dementsprechend mit Kamera 2 detektiert. Es zeigte sich jedoch, dass der Emissionsstrahlengang polarisationsabhängige Transmissionseigenschaften besitzt. p polarisiertes Licht wurde besser transmittiert, als s polarisiertes Licht. Die dichroitischen Spiegel trugen hierzu bei, da deren Transmissions- bzw. Reflexionseigenschaften polarisationsabhängig sind (siehe Abbildungen A.1 und A.2). Dies wird dadurch bestätigt, dass bei Verwendung des 3-Farben- und des 4-Farben dichroitischen Spiegels ein unterschiedliches Transmissionsverhältnis von 0,82 bzw. 0,78 gemessen wurde. Gemäß den Spezifikationen der dichroitischen Spiegel sollte das Verhältnis in beiden Fällen jedoch ca. 0,9 betragen. Somit mussten noch andere optische Komponenten im Emissionsstrahlengang vorhanden sein, die ebenfalls polarisieren. Mit Hilfe des G-Faktors konnten diese Unterschiede in der Transmission beider Polarisationsrichtungen kompensiert werden. Zusätzlich werden durch den G-Faktor Unterschiede in der Sensitivität beider Kameras ausgeglichen. Die Sensitivität ist zwar nicht polarisationsabhängig, kann sich aber bei verschiedenen Aufnahmeeinstellungen stark unterscheiden.

Da Objektive die Polarisation des Lichts beeinflussen können (Axelrod, 1989; Tramier et al., 2000; Shribak et al., 2002) wurden sie in den zuvor beschriebenen Transmissions-Untersuchungen nicht verwendet. Deren Einfluss wurde unter realen experimentellen Bedingungen bei Lebendzellmessungen analysiert. Die Fluoreszenzpolarisationsanisotropie des Farbstoffs Cerulean, der keine FRET-bedingte Anisotropieverringering zeigte, wurde mit verschiedenen Objektiven gemessen. Mit steigender N.A. waren abnehmende Werte der Fluoreszenzpolarisationsanisotropie zu erwarten (Axelrod, 1989; Shribak et al., 2002). In Übereinstimmung damit wurden mit dem 40x Pol Objektiv, mit einer N.A. von 0,65, der höchste Wert gemessen. Mit allen anderen Objektiven wurde allerdings nur eine leicht verringerte Fluoreszenzpolarisationsanisotropie gemessen. Vermutlich wurden die Werte nur leicht verringert, da durch die Lochblende in konfokalen Mikroskopen die Lichtanteile eliminiert werden können, deren Polarisationsrichtung durch die Objektive verändert werden (Wilson und Juskaitis, 1995; Inami und Kawata, 2000). Da die Auflösung des 40x Pol Objektivs für viele Anwendungen nicht ausreichte, wurden in allen Experimenten die PlanApo Objektive verwendet. Außerdem korrigieren diese Abbildungsfehler besser.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Aufbau die Fluoreszenzanregung mit linear polarisiertem Licht ermöglicht. Der Emissionsstrahlengang besitzt leicht polarisierende Eigenschaften, die aber durch den G-Faktor kompensiert werden können. Die Plan Apochromat Objektive verringern die Fluoreszenzpolarisationsanisotropie zwar leicht (auf ca. 88 %), trotzdem zeigte sich, dass sie aufgrund anderer Vorteile für Lebendzellmessungen am besten geeignet sind.

4.5 Validierung des Messplatzes für Lebendzellmessungen mit FRET-Referenzstandards

Bei der Bestimmung der Polarisationsanisotropie von Fluoreszenzmolekülen in Lösungen spielt die Rotation der Moleküle eine entscheidende Rolle. Rotiert das Molekül während dessen Fluoreszenzlebenszeit, so verringert sich die Polarisationsanisotropie. Dies wird durch die sogenannte Perrin-Gleichung beschrieben ([Lakowicz et al., 1979](#)):

$$r = r_0 \left(1 + \frac{\tau}{\tau_r} \right)^{-1} \quad (4.8)$$

r_0 bezeichnet die Polarisationsanisotropie ohne Rotation und r die Polarisationsanisotropie im Gleichgewicht. τ ist die Fluoreszenzlebenszeit und τ_r die Rotationsrelaxationszeit. Für isotrop verteilte Fluoreszenzmoleküle ergibt sich mit Gleichungen [1.17](#) und [4.8](#):

$$r = \left(\frac{3}{5} \cos^2 \alpha - \frac{1}{5} \right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_r} \right)^{-1} \quad (4.9)$$

[Swaminathan et al. \(1997\)](#) bestimmten für GFP im Zytoplasma von Zellen eine Rotationsrelaxationszeit von $\tau_r = 36 \pm 2$ ns und eine Fluoreszenzlebenszeit von $\tau = 2,6 \pm 0,1$ ns. Diese Ergebnisse wurden durch weitere Publikationen bestätigt ([Dayel, 1999](#); [Gautier et al., 2001](#)). Folglich rotieren GFP-Moleküle nur wenig während sie ihre Anregungsenergie in Form von Fluoreszenz abgeben. Gemäß Formel [4.8](#) reduziert die Rotation die Fluoreszenzpolarisationsanisotropie lediglich um einen Faktor von ca. 0,93.

FRET zwischen Cerulean und Venus

In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen theoretischen Erwartungen wurden für alle Lebendzellfarbstoffe Cerulean und Venus hohe Werte von über 0,30 für die Fluoreszenzpolarisationsanisotropie gemessen. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten ([Piston und Rizzo, 2008](#); [Sarkar et al., 2009](#)). Dass die Rotation die Fluoreszenzpolarisation unwesentlich beeinflusst wird durch die Beobachtung bestätigt, dass für das Konstrukt C5A nur eine minimale Zunahme der Fluoreszenzpolarisationsanisotropie zu beobachten war. C5A hat die gleichen fluoreszierenden Eigenschaften wie Cerulean, ist jedoch ein deutlich größeres Konstrukt und rotiert somit langsamer.

Für die blau und gelb fluoreszierenden Farbstoffe Cerulean und Venus wurden Anregungswellenlängen von 405 nm und 488 nm verwendet. Wie anhand der Spektren in Abbildung [A.5a](#) im Anhang zu sehen liegt 405 nm auf der kurzwelligen Seite des Cerulean Anregungsmaximums. Dies hat zur Folge, dass Cerulean nicht mit optimaler Effizienz angeregt wird. Die kurzwelligere Anregung ermöglicht es jedoch mit höherer Selektivität nur den Donor (Cerulean) anzuregen. Der Akzeptor (Venus) zeigte bei 405 nm Anregung nahezu keinerlei Fluoreszenz. Durch die Wahl einer kurzwelligeren Anregung ließ sich somit die unerwünschte gleichzeitige Anregung von Donor und Akzeptor minimieren ([Piston und Kremers, 2007](#)).

Cerulean ließ sich, wie gemäß der Spektren zu erwarten (siehe Abbildung [A.5a](#)), nicht mit Licht der Wellenlänge 488 nm anregen. Allerdings fluoreszierte Cerulean bei 405 nm Anregung nicht nur blau, sondern auch deutlich gelb. Diese unerwünschte Emissions-Einstreuung wird durch das sehr breite Emissionsspektrum von Cerulean bedingt (siehe Abbildung [A.5b](#)). Dies ist praktisch

unvermeidlich, da ein Überlapp zwischen dem Donoremissions- und dem Akzeptoranregungsspektrum eine Voraussetzung für den FRET Prozess ist. Aufgrund dieser Tatsache ist es im Allgemeinen schwierig den Anteil des Fluoreszenzsignals zu bestimmen, der vom Akzeptor kommt. Für intensitätsbasierte 2-Farbenverhältnismessungen sind deshalb oft aufwendige Normierungen nötig. Wie in diesen Experimenten gezeigt werden konnte, führt die Emissions-Einstreuung jedoch nicht zur Reduktion der Polarisationsanisotropie. Dies ist ein Vorteil der polarisationsanisotropiebasierten FRET Methode. C5V ist ein Konstrukt, in dem Cerulean über 5 Aminosäuren mit Venus verbunden ist. Dadurch sind beide Proteine räumlich sehr nahe und FRET kann stattfinden. Bei Anregung des Donors (Cerulean) und Detektion der gelben Fluoreszenz konnte eine starke Reduktion der Fluoreszenzpolarisationsanisotropie detektiert werden. Ein Teil der Anregungsenergie des Donors wird über FRET auf den Akzeptor übertragen. Da dieser mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht die exakt gleiche Ausrichtung wie der Donor besitzt, ist dessen Fluoreszenzlicht weniger stark polarisiert. Die Fluoreszenzpolarisationsanisotropie verringert sich folglich. Die Fluoreszenzpolarisationsanisotropie des Donors bleibt jedoch unverändert. Auf diese Weise konnte FRET über Fluoreszenzpolarisationsanisotropie detektiert werden. Diese Ergebnisse stimmen gut mit der Publikation von [Rizzo und Piston \(2005\)](#) überein.

Waren die Zellen mit Cerulean und Venus in unkonjugierter Form transfiziert, so war ebenfalls eine leichte Reduktion der Polarisationsanisotropie für die gelbe Fluoreszenz bei 405 nm Anregung detektierbar. Allein durch die rein zufällige Verteilung der Fluoreszenzproteine kann ebenfalls FRET stattfinden, jedoch mit deutlich geringerer Effizienz. Für das Konstrukt C5V wurde auch bei 488 nm Anregung und Detektion der gelben Fluoreszenz eine leicht verringerte Polarisationsanisotropie beobachtet. Da sich Cerulean nicht durch 488 nm anregen lässt, kann diese Reduktion nicht durch FRET von Cerulean auf Venus bedingt sein. Wie [Lidke et al. \(2003\)](#) zeigen konnten, nimmt mit steigender Venus Konzentration die gemessene Polarisationsanisotropie ab. Dies wird durch FRET zwischen gleichen Chromophoren bedingt (homoFRET). Die Reduktion der Polarisationsanisotropie der gelben Fluoreszenz bei 488 nm Anregung wird somit nicht durch das Konstrukt C5V an sich, sondern durch die hohe Konzentration an Venus bedingt.

FRET zwischen GFP und mCherry

Für eine höhere Flexibilität in der Wahl der fluoreszierenden Markierungen wurde der Aufbau auch auf seine Anwendbarkeit für grün und rot fluoreszierende Proteine getestet. Es wurden die Fluoreszenzproteine GFP und mCherry verwendet. Die Fluoreszenz des Donors (GFP) wurde mit 488 nm, die des Akzeptors (mCherry) mit 561 nm angeregt. Im Gegensatz zur Cerulean/Venus Paarung konnte in diesem Fall die Fluoreszenz des Akzeptors (mCherry) mit dem Anregungslicht des Donors angeregt werden. Wie in den Spektren in Abbildung [A.7a](#) im Anhang zu sehen, entspricht dies den Erwartungen. Insofern führte die grün/rot Kombination zu einer Anregungseinstreuung.

Analog zu den Ergebnissen für Cerulean und Venus, wurden auch für GFP und mCherry Fluoreszenzpolarisationsanisotropien von meist über 0,30 gemessen. Bei 488 nm Anregung und Detektion der grünen Fluoreszenz zeigte GFP jedoch leicht verringerte Werte. Da GFP die Tendenz besitzt zu aggregieren, wird diese Reduktion wahrscheinlich durch homoFRET bedingt ([Bader et al., 2009](#)). Dass die Werte jedoch nur leicht verringert sind, deutet auf eine geringe Effizienz dieser Prozesse hin.

Analog zu den Experimenten mit blau/gelb fluoreszierenden Proteinen wurde auch hier ein Konstrukt verwendet, in dem die beiden Fluoreszenzproteine gekoppelt sind. In dem Konstrukt namens pByffu ist GFP mit mCherry über 13 Aminosäuren verbunden. Durch die resultierende räumliche Nähe beider Fluoreszenzproteine konnte FRET stattfinden. Bei Anregung des Donors

mit 488 nm wurde dementsprechend eine deutliche Reduktion der Fluoreszenzpolarisationsanisotropie des Akzeptors bestimmt. Somit konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Versuchsaufbau auch die Detektion von FRET zwischen den Fluoreszenzproteinen GFP und mCherry ermöglicht.

Bestätigung von FRET durch die Methode des Akzeptorbleichens

Bei der Detektion von FRET mittels Akzeptorbleichen werden die photochemischen Eigenschaften des Akzeptors durch intensive Belichtung zerstört. Danach kann der Akzeptor nicht mehr als solcher fungieren und der FRET-Prozess wird unterbunden. Die Fluoreszenzintensität des Donors steigt dadurch an. Ist der Akzeptor zerstört, so kann dies jedoch nicht einfach rückgängig gemacht werden. Insofern ist diese Methode für die Langzeitbeobachtung von Zellen völlig ungeeignet. Trotzdem kann sie vor Beendigung eines Experiments zur Bestätigung von positiven FRET Ergebnissen herangezogen werden. Um das System auf diese Anwendbarkeit zu prüfen, wurde der Akzeptor (Venus) im C5V Konstrukt gebleicht. Die blaue und gelbe Fluoreszenzintensität wurde vor und nach dem Bleichen gemessen. Die Fluoreszenzintensität des gelben Signals verringerte sich, während die des blauen Signals deutlich zunahm. Somit konnte das zuvor mittels Polarisationsanisotropie gemessene FRET Signal durch die Methode des Akzeptorbleichens bestätigt werden.

FRET Messungen mittels nicht konfokaler Detektion der Polarisationsanisotropie

Polarisationsanisotropiebasierte FRET-Messungen wurde auch in einem nicht konfokalen Messaufbau untersucht. Hierbei wurde die Spinning-Disk Einheit nicht verwendet. Die Fluoreszenz wurde mit einer Quecksilberdampflampe angeregt. Mit Hilfe von Anregungsfiltern wurde der gewünschte Wellenlängenbereich gewählt. Durch das Anbringen eines zusätzlichen Polarisators wurde das Anregungslicht polarisiert. Das Emissionslicht wurde um die Spinning-Disks umgelenkt.

Analog zur konfokalen Methode wurde der Polarisator im Anregungslicht ausgerichtet und der G-Faktor für den Emissionsstrahlengang bestimmt. Auch bei dieser nicht konfokalen Detektion zeigten die gekoppelten Konstrukte C5V und pByffu eine deutlich geringere Fluoreszenzpolarisationsanisotropie wie die nicht gekoppelten Fluoreszenzproteine. Allerdings waren alle Werte um einen Faktor von ca. 2 geringer als bei der konfokalen Messmethode. Wie in Abschnitt 4.4 beschrieben, können Objektive mit einer hohen numerischen Apertur die Polarisationsanisotropie beeinflussen. Bei der konfokalen Messmethode werden durch die Lochblende jedoch Lichtanteile eliminiert, deren Polarisationsrichtung verändert wurde. Aus diesem Grund wurden mit der konfokalen Messmethode deutlich höhere Werte für die Fluoreszenzpolarisationsanisotropie gemessen als mit der nicht konfokalen Methode.

4.6 Anwendungen der FRET-Messmethode auf biologische Fragestellungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit ein Aufbau entwickelt, der die FRET Detektion mittels Fluoreszenzpolarisationsanisotropie ermöglicht. Das System wurde mit Referenzstandards für die Verwendung von blau/gelben und grün/roten Paaren von Fluoreszenzproteinen validiert. FRET findet nur dann statt, wenn sich die Proteine in unmittelbarer Nähe befinden, typischerweise in einem Abstand unter 10 nm. Die Untersuchung molekularer Prozesse auf dieser Ebene ist in

Zukunft mit dem Aufbau möglich. Erste Schritte zur biologischen Anwendung wurden bereits unternommen.

Detektion der Chromatinkondensation mittels FRET

Llères et al. (2009) konnten zeigen, dass es mittels FRET möglich ist die Kondensierung des Chromatins zu untersuchen. Es wurden humane Zellen verwendet, die zwei verschiedenartig markierte H2B Histone gleichzeitig exprimierten. Die Histone waren entweder mit GFP oder mit mCherry markiert. Durch die Kondensierung des Chromatins kommen sich H2B Histone aus unterschiedlichen Nukleosomen sehr nahe. Sind diese Histone mit GFP und mCherry markiert, so kann FRET stattfinden. Llères et al. (2009) detektierten FRET über Fluoreszenzlebenszeitmessungen des Donors. Sie konnten in Interphasezellen und in mitotischen Zellen Bereiche mit unterschiedlicher Chromatinkondensation bestimmen. Auch bei chemischer Behandlung mit TSA und ATP-Entzug konnten sie Veränderungen in der Chromatinkondensation bestimmen. Die Unterschiede in der FRET-Effizienz waren in allen Fällen kleiner als 12 %.

Die quantitative Bestimmung der FRET-Effizienz mit der Fluoreszenzpolarisationsanisotropiemethode ist sehr schwierig. Koushik et al. (2006) bestimmten für das C5V Konstrukt mit verschiedenen Methoden eine FRET-Effizienz von ca. 40 %. Somit ist die FRET-Effizienz in den Chromatinkondensationsmessungen deutlich kleiner. Mit dem hier vorgestellten Aufbau konnten keine Unterschiede in der Polarisationsanisotropie infolge der Chromatinkondensation festgestellt werden. Wie zuvor beschrieben, tritt bei der Kombination der Fluoreszenzproteine GFP und mCherry sowohl Emissions-Einstreuung als auch Anregungs-Einstreuung auf. Wahrscheinlich ist auf diesem Hintergrundsignal das schwache FRET-Signal nicht detektierbar. Die Verwendung der Fluoreszenzproteine Cerulean und Venus hätte den Vorteil einer geringeren Anregungs-Einstreuung. Diese Kombination gilt als die beste FRET-Paarung (Piston und Rizzo, 2008) und liese somit eine höhere Sensitivität erwarten. Theoretisch wäre es auch möglich, dass die Fluoreszenzproteine GFP und mCherry im kondensierten Chromatin eine feste relative Ausrichtung zeigen. Wäre die Orientierung beider Fluoreszenzproteine parallel, so würde der FRET Prozess die Fluoreszenzpolarisationsanisotropie nicht verringern. In einem solchen Fall wäre FRET über die Fluoreszenzpolarisationsanisotropiemethode nicht detektierbar. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass sich FRET mit dieser Methode nicht ausschließen lässt. Da unerwünschte Effekte wie Emissions- und Anregungs-Einstreuung die Polarisationsanisotropie nicht verringern, ist diese Methode aber sehr robust gegen fälschlich positive Interpretationen von Ergebnissen.

Untersuchung der 53BP1-Oligomerisierung mittels homoFRET

HomoFRET bezeichnet den Energietransfer zwischen zwei gleichen Chromophoren (Bader et al., 2011). Die Chromophore können hierbei sowohl als Donor als auch als Akzeptor wirken. Über Fluoreszenzpolarisationsanisotropiemessungen kann dieser Prozess detektiert werden. Für das Reparaturprotein 53BP1 wurden in der Literatur oligomerisierende Eigenschaften beschrieben (Adams et al., 2005; Zgheib et al., 2009). In den Messungen nach Au-Ionenbestrahlung zeigte sich jedoch eine einheitliche Polarisationsanisotropie in der gesamten Zelle. Die Werte betrugen $0,29 \pm 0,04$ sowohl in, als auch außerhalb der strahleninduzierten Foci. Eine strahlungsabhängige Oligomerisierung von 53BP1 war mittels homoFRET somit nicht detektierbar.

Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden umfangreiche Studien zur Akkumulation und zum Bindeverhalten von Reparaturproteinen an DNA Schäden nach dicht ionisierender Strahlung vorgestellt. Die Ergebnisse geben Einblicke in die Mobilität der Proteine, die zeitliche Entstehung der Bindungsstellen am DNA Schaden sowie in die Bindungseigenschaften der einzelnen Proteine.

In zukünftigen Arbeiten sollen diese Ergebnisse in einem einzigen mathematischen, kinetischen Modell vereint werden. Dies soll helfen die mechanistischen Zusammenhänge besser verstehen und experimentell überprüfen zu können. Ein Modell mit ähnlichen theoretischen Ansätzen zum Reparaturmechanismus der Nicht Homologen Endverknüpfung wurde vor Kurzem von [Li und Cucinotta \(2011\)](#) publiziert. Durch die Kombination der Microbeam Ionenbestrahlung mit simultanen FRAP Analysen könnte in Zukunft die Proteinkinetik in individuellen Zellen vor und nach gezielter Ionenbestrahlung analysiert werden. Mithilfe dieser experimentellen Ergebnisse könnte das kinetische Modell validiert und ergänzt werden. Erste Schritte für einen derartigen Aufbau wurden bereits unternommen ([Merk et al., 2010](#)). Zusätzlich zum dynamischen Verhalten spielt die Proteininteraktion in nahezu allen biologischen Prozessen eine zentrale Rolle. Der neu entwickelte FRET Aufbau wird es in Zukunft ermöglichen, das gegenseitige Binden der Proteine mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung zu untersuchen.

Anhang

A.1 Spektren der optischen Komponenten im FRET-Aufbau

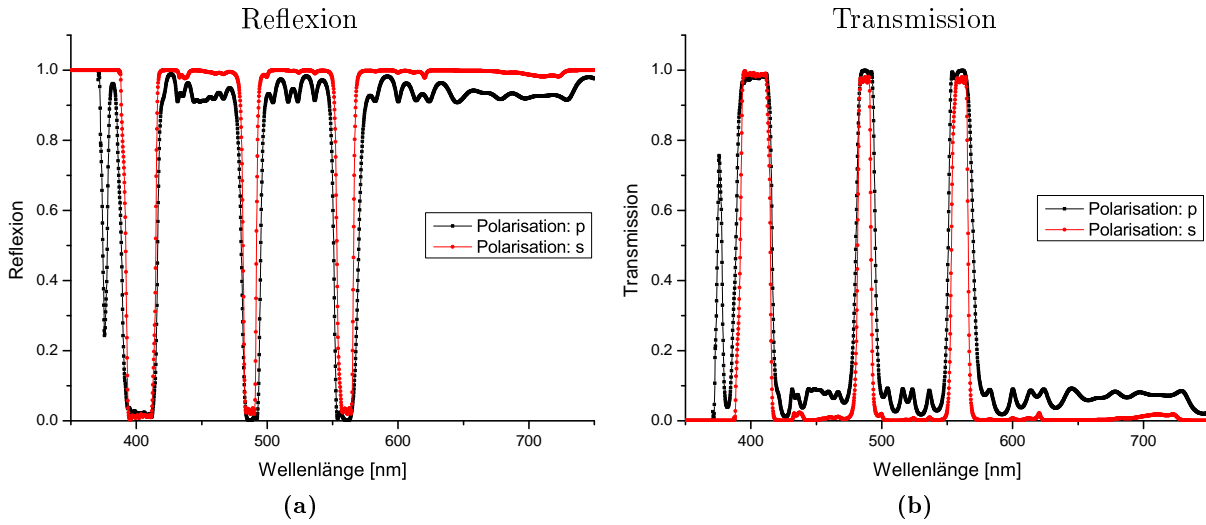


Abbildung A.1: Spektrale Eigenschaften des 3-Farben dichroitischen Spiegels Di01-405/488/561 von Semrock (New York, USA) für die s- und p-Polarisation unter einem Einfallswinkel von 45° . In der Spinning-Disk Einheit wird das Anregungslicht transmittiert und das Emissionslicht reflektiert. (a): Reflexionsspektrum (b): Transmissionsspektrum (Quelle der Spektren: [Semrock, 2011a](#))

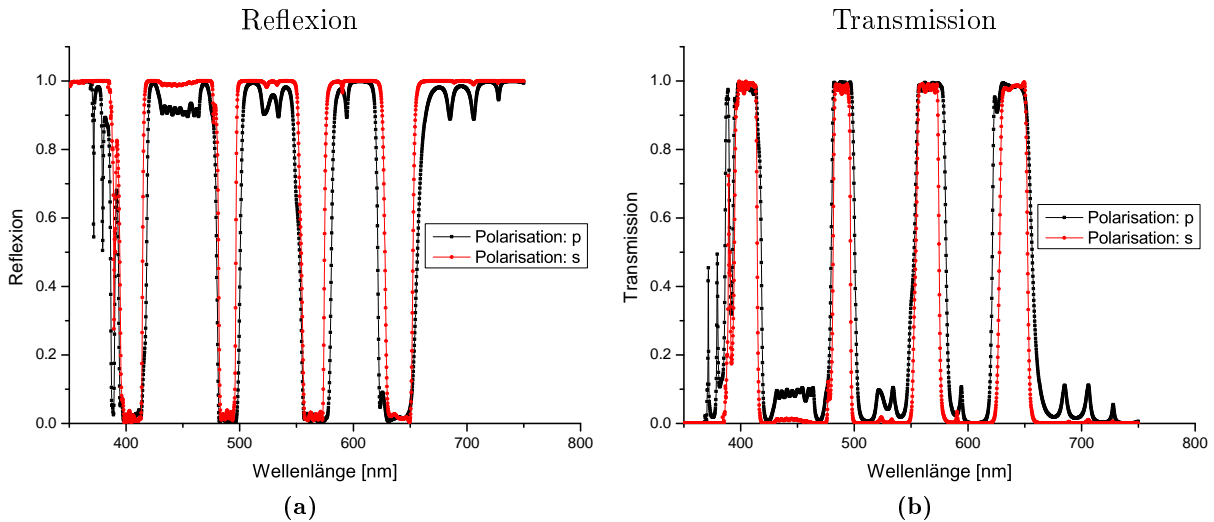


Abbildung A.2: Spektrale Eigenschaften des 4-Farben dichroitischen Spiegels Di01-T405/488/568/647 von Semrock für die s- und p-Polarisation unter einem Einfallswinkel von 45° . In der Spinning-Disk Einheit wird das Anregungslicht transmittiert und das Emissionslicht reflektiert. (a): Reflexionsspektrum (b): Transmissionsspektrum (Quelle der Spektren: [Semrock, 2011b](#))

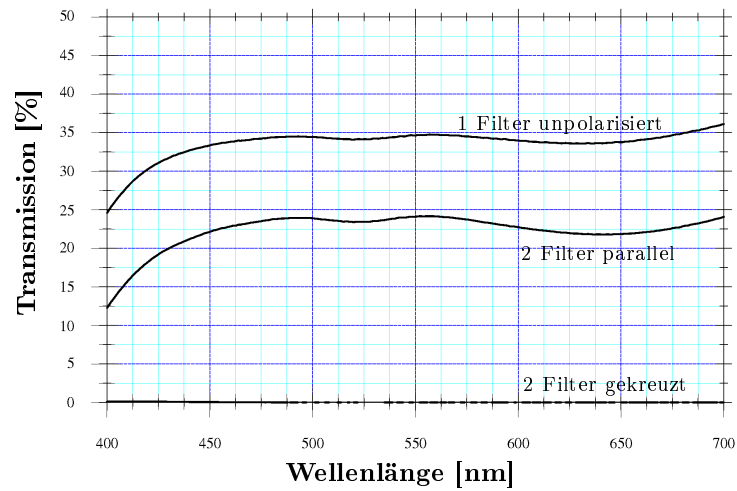


Abbildung A.3: Spektrale Eigenschaften des Polarisators, hier dargestellt für die montierte Variante zwischen zwei Deckgläsern mit den Bezeichnungen 069-0110 und 0120 von Optosigma (Santa Ana, USA). In dem hier vorgestellten Aufbau wurde die nicht montierte Variante 069-1105 verwendet ([OptoSigma-Corporation, 2011](#)).

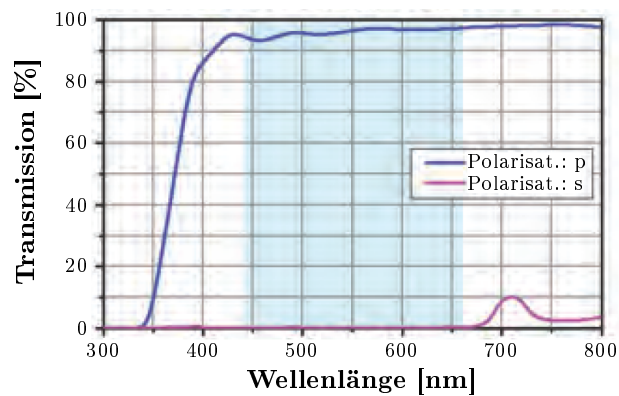


Abbildung A.4: Spektrale Eigenschaften des Polarisationsstrahlteilers PBS201 von Thorlabs (Dachau/München, Deutschland) ([Thorlabs, 2011](#)).

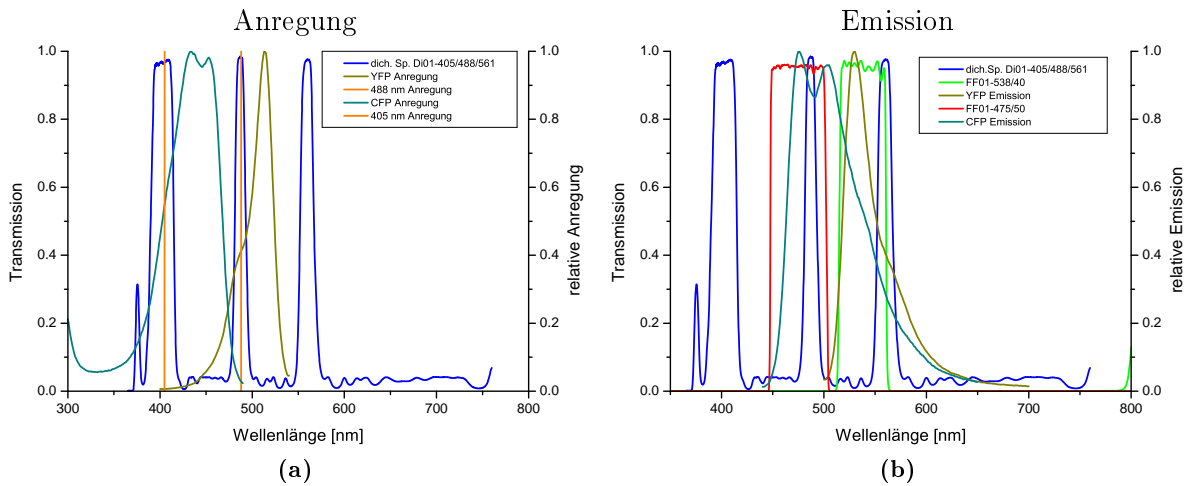


Abbildung A.5: Spektrale Eigenschaften der blau (CFP) und gelb (YFP) fluoreszierenden Proteine und der entsprechenden optischen Komponenten bei konfokalen FRET Messungen. Im Gegensatz zur konventionellen Epi Fluoreszenzmikroskopie wird in der Spinning-Disk Einheit das Anregungslicht durch den dichroitischen Spiegel transmittiert und das Emissionslicht wird reflektiert. (a): Laser Anregungswellenlängen und dichroitischer Spiegel im Vergleich zu den CFP und YFP Anregungsspektren (b): Spektren der Emissionsfilter und des dichroitischen Spiegels im Vergleich zu den CFP und YFP Emissionsspektren. Der dichroitische Spiegel und die Filter sind von Semrock. (Quellen der Spektren der optischen Komponenten: [Semrock, 2011a,e](#); [Laser2000, 2011](#)), (Quellen der CFP und YFP Spektren: [Invitrogen, 2011a,b](#)).

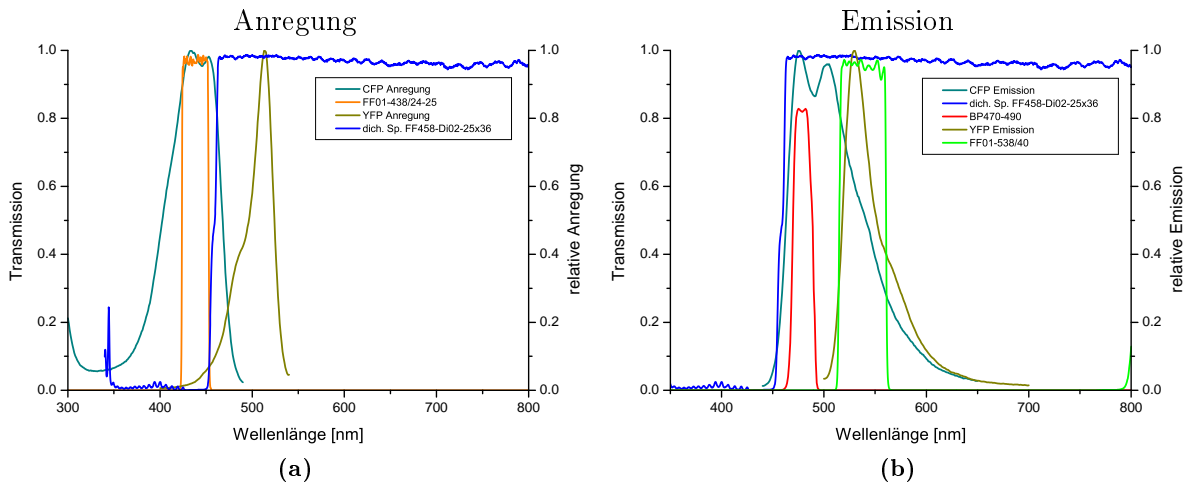


Abbildung A.6: Spektrale Eigenschaften der blau (CFP) und gelb (YFP) fluoreszierenden Proteine und der entsprechenden optischen Komponenten bei nicht konfokalen FRET Messungen. (a): Spektren des Anregungsfilters und des dichroitischen Spiegels im Vergleich zu den CFP und YFP Anregungsspektren (b): Spektren der Emissionsfilter und des dichroitischen Spiegels im Vergleich zu den CFP und YFP Emissionsspektren. Der dichroitische Spiegel und die Filter FF01-438/24-25 und FF01-538/40 sind von Semrock. Der Filter BP470-490 ist von Olympus (Hamburg, Deutschland). (Quellen der Spektren der optischen Komponenten: [Semrock, 2011d,e,c](#); [Olympus, 2011a](#)), (Quellen der CFP und YFP Spektren: [Invitrogen, 2011a,b](#)).

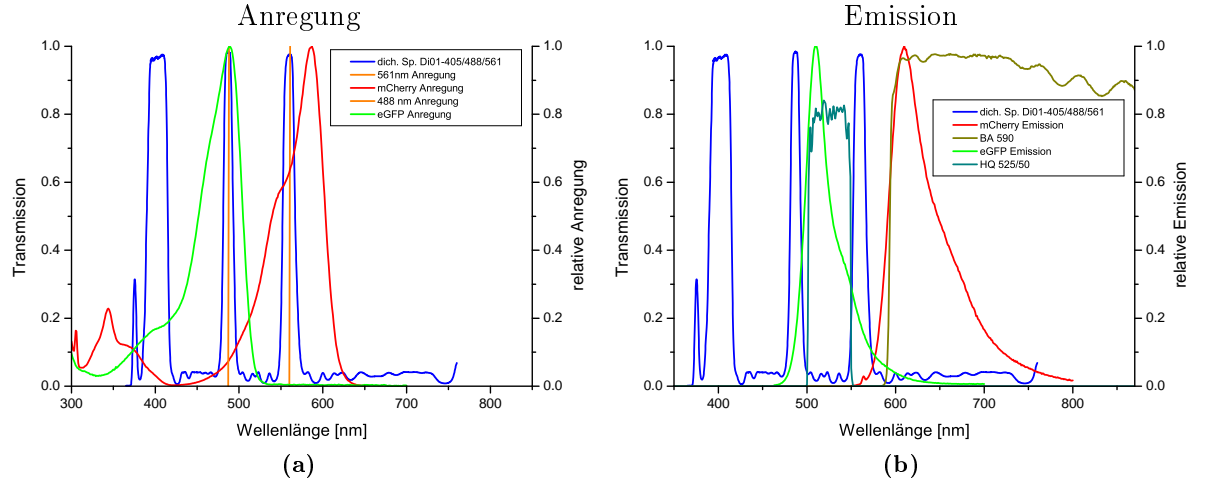


Abbildung A.7: Spektrale Eigenschaften der grün (GFP) und rot (mCherry) fluoreszierenden Proteine und der entsprechenden optischen Komponenten bei konfokalen FRET Messungen. Im Gegensatz zur konventionellen Epi Fluoreszenzmikroskopie wird in der Spinning-Disk Einheit das Anregungslicht durch den dichroitischen Spiegel transmittiert und das Emissionslicht wird reflektiert. (a): Laser Anregungswellenlängen und dichroitischer Spiegel im Vergleich zu den GFP und mCherry Anregungsspektren (b): Spektren der Emissionsfilter und des dichroitischen Spiegels im Vergleich zu den GFP und mCherry Emissionsspektren. Der dichroitische Spiegel ist von Semrock, der Filter BA 590 ist von Olympus, der HQ525/50 Filter ist von Chroma (Bellows Falls, USA). (Quellen der Spektren der optischen Komponenten: [Semrock, 2011a](#); [Olympus, 2011b](#); [Chroma, 2011](#)), (Quelle der GFP und mCherry Spektren: [Tsien-Laboratory, 2011](#)).

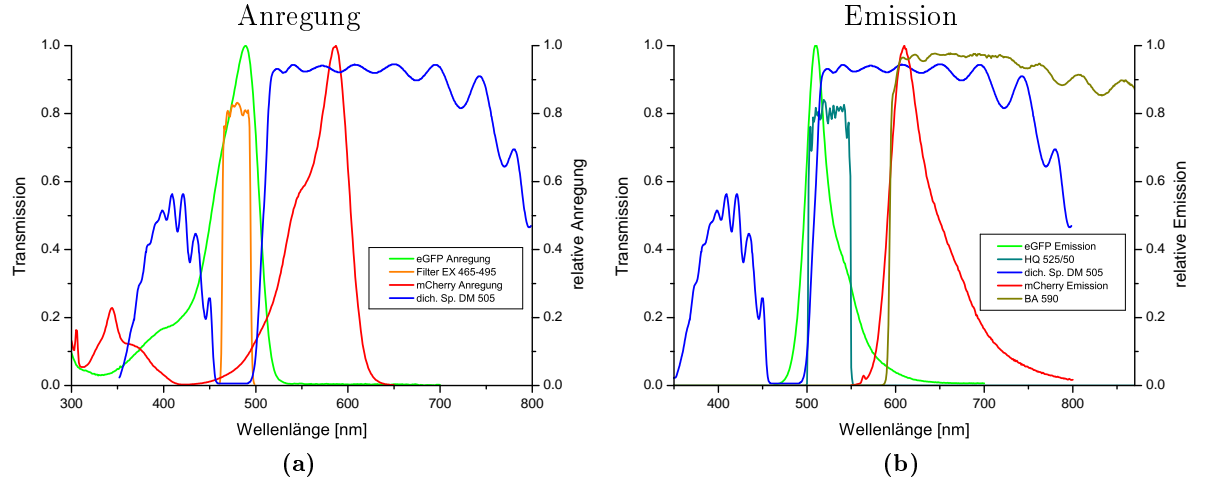


Abbildung A.8: Spektrale Eigenschaften der grün (GFP) und rot (mCherry) fluoreszierenden Proteine und der entsprechenden optischen Komponenten bei nicht konfokalen FRET Messungen. (a): Spektren des Anregungsfilters und des dichroitischen Spiegels im Vergleich zu den GFP und mCherry Anregungsspektren (b): Spektren der Emissionsfilter und des dichroitischen Spiegels im Vergleich zu den GFP und mCherry Emissionsspektren. Dichroitischer Spiegel und Filter EX 465-495 sind von Nikon (Düsseldorf, Deutschland). Der Filter HQ 525/50 ist von Chroma, der Filter BA 590 ist von Olympus. (Quellen der Spektren der optischen Komponenten: [Nikon, 2011](#); [Olympus, 2011b](#); [Chroma, 2011](#)), (Quelle der GFP und mCherry Spektren: [Tsien-Laboratory, 2011](#)).

Literaturverzeichnis

- [Adams et al. 2005] ADAMS, M. M. ; WANG, B. ; XIA, Z. ; MORALES, J. C. ; LU, X. ; DONEHOWER, L. A. ; BOCHAR, D. A. ; ELLEDGE, S. J. ; CARPENTER, P. B.: 53BP1 oligomerization is independent of its methylation by PRMT1. In: *Cell Cycle* 4 (2005), Dezember, Nr. 12, S. 1854–1861
- [Alberts 2001] ALBERTS, B.: *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 2. Wiley-VCH, 2001
- [Arrio-Dupont et al. 2000] ARRIO-DUPONT, M. ; FOUCAULT, G. ; VACHER, M. ; DEVAUX, P. F. ; CRIBIER, S.: Translational diffusion of globular proteins in the cytoplasm of cultured muscle cells. In: *Biophysical Journal* 78 (2000), Februar, Nr. 2, S. 901–907
- [Asaithamby und Chen 2009] ASAITHAMBY, A. ; CHEN, D. J.: Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose gamma-irradiation. In: *Nucleic Acids Research* 37 (2009), Juli, Nr. 12, S. 3912–3923
- [Axelrod 1979] AXELROD, D.: Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. In: *Biophysical Journal* 26 (1979), Juni, Nr. 3, S. 557–573
- [Axelrod 1989] AXELROD, D.: Fluorescence polarization microscopy. In: *Methods in Cell Biology* 30 (1989), S. 333–352
- [Axelrod et al. 1976] AXELROD, D. ; KOPPEL, D. E. ; SCHLESSINGER, J. ; ELSON, E. ; WEBB, W. W.: Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. In: *Biophysical Journal* 16 (1976), September, Nr. 9, S. 1055–1069
- [Bader et al. 2011] BADER, A. N. ; HOETZL, S. ; HOFMAN, E. G. ; VOORTMAN, J. ; HENEGOUWEN, P. M. P. van Bergen en ; MEER, G. van ; GERRITSEN, H. C.: Homo-FRET imaging as a tool to quantify protein and lipid clustering. In: *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* 12 (2011), Februar, Nr. 3, S. 475–483
- [Bader et al. 2009] BADER, A. N. ; HOFMAN, E. G. ; VOORTMAN, J. ; HENEGOUWEN, P. M. P. van Bergen en ; GERRITSEN, H. C.: Homo-FRET imaging enables quantification of protein cluster sizes with subcellular resolution. In: *Biophysical Journal* 97 (2009), November, Nr. 9, S. 2613–2622
- [Bakkenist und Kastan 2003] BAKKENIST, C. J. ; KASTAN, M. B.: DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. In: *Nature* 421 (2003), Januar, Nr. 6922, S. 499–506
- [Ball et al. 2007] BALL, H. L. ; EHRHARDT, M. R. ; MORDES, D. A. ; GLICK, G. G. ; CHAZIN,

- W. J. ; CORTEZ, D.: Function of a conserved checkpoint recruitment domain in ATRIP proteins. In: *Molecular and Cellular Biology* 27 (2007), Mai, Nr. 9, S. 3367–3377
- [Ball et al. 2005] BALL, H. L. ; MYERS, J. S. ; CORTEZ, D.: ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation. In: *Molecular Biology of the Cell* 16 (2005), Mai, Nr. 5, S. 2372–2381
- [Bancaud et al. 2009] BANCAUD, A. ; HUET, S. ; DAIGLE, N. ; MOZZICONACCI, J. ; BEAUDOUIN, J. ; ELLENBERG, J.: Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. In: *The EMBO Journal* 28 (2009), November, Nr. 24, S. 3785–3798
- [Barkas 1963] BARKAS, W. H.: *Nuclear Research Emulsions*. Bd. I. Academic Press, 1963
- [Bass et al. 1995] BASS, M. ; STRYLAND, E. W. . V. ; WILLIAMS, D. R. .. ; WOLFE, W. L. .. ; BASS, M. (Hrsg.): *Handbook of Optics, Volume 1: Fundamentals, Techniques, and Design. Second Edition*. 2. McGraw-Hill Professional, 1995
- [Beaudouin et al. 2006] BEAUDOUIN, J. ; MORA-BERMÚDEZ, F. ; KLEE, T. ; DAIGLE, N. ; ELLENBERG, J.: Dissecting the contribution of diffusion and interactions to the mobility of nuclear proteins. In: *Biophysical Journal* 90 (2006), März, Nr. 6, S. 1878–1894
- [Bekker-Jensen et al. 2006] BEKKER-JENSEN, S. ; LUKAS, C. ; KITAGAWA, R. ; MELANDER, F. ; KASTAN, M. B. ; BARTEK, J. ; LUKAS, J.: Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. In: *The Journal of Cell Biology* 173 (2006), April, Nr. 2, S. 195–206
- [Bekker-Jensen et al. 2005] BEKKER-JENSEN, S. ; LUKAS, C. ; MELANDER, F. ; BARTEK, J. ; LUKAS, J.: Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. In: *The Journal of Cell Biology* 170 (2005), Juli, Nr. 2, S. 201–211
- [Bekker-Jensen et al. 2010] BEKKER-JENSEN, S. ; RENDTLEW DANIELSEN, J. ; FUGGER, K. ; GROMOVA, I. ; NERSTEDT, A. ; LUKAS, C. ; BARTEK, J. ; LUKAS, J. ; MAILAND, N.: HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. In: *Nature Cell Biology* 12 (2010), Januar, Nr. 1, S. 80–86
- [Bethe 1930] BETHE, H.: Zur Theorie des Durchgangs schneller Korpuskularstrahlen durch Materie. In: *Annalen der Physik* 397 (1930), Januar, Nr. 3, S. 325–400
- [Bhatti et al. 2011] BHATTI, S. ; KOZLOV, S. ; FAROOQI, A. A. ; NAQI, A. ; LAVIN, M. ; KHANNA, K. K.: ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. In: *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 68 (2011), September, Nr. 18, S. 2977–3006
- [Blainey et al. 2009] BLAINEY, P. C. ; LUO, G. ; KOU, S. C. ; MANGEL, W. F. ; VERDINE, G. L. ; BAGCHI, B. ; XIE, X. S.: Nonspecifically bound proteins spin while diffusing along DNA. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (2009), Dezember, Nr. 12, S. 1224–1229
- [Bloch 1933a] BLOCH, F.: Bremsvermögen von Atomen mit mehreren Elektronen. In: *Zeitschrift für Physik* 81 (1933), Mai, S. 363–376
- [Bloch 1933b] BLOCH, F.: Zur Bremsung rasch bewegter Teilchen beim Durchgang durch Materie. In: *Annalen der Physik* 408 (1933), Januar, Nr. 3, S. 285–320
- [Bomgarden et al. 2004] BOMGARDEN, R. D. ; YEAN, D. ; YEE, M. ; CIMPRICH, K. A.: A

- novel protein activity mediates DNA binding of an ATR-ATRIP complex. In: *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), April, Nr. 14, S. 13346–13353
- [Botuyan et al. 2006] BOTUYAN, M. V. ; LEE, J. ; WARD, I. M. ; KIM, J. ; THOMPSON, J. R. ; CHEN, J. ; MER, G.: Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. In: *Cell* 127 (2006), Dezember, Nr. 7, S. 1361–1373
- [Braga et al. 2004] BRAGA, J. ; DESTERRO, J. M. P. ; CARMO-FONSECA, M.: Intracellular macromolecular mobility measured by fluorescence recovery after photobleaching with confocal laser scanning microscopes. In: *Molecular Biology of the Cell* 15 (2004), Oktober, Nr. 10, S. 4749–4760
- [Burma et al. 2001] BURMA, S. ; CHEN, B. P. ; MURPHY, M. ; KURIMASA, A. ; CHEN, D. J.: ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), November, Nr. 45, S. 42462–42467
- [Calapez et al. 2002] CALAPEZ, A. ; PEREIRA, H. M. ; CALADO, A. ; BRAGA, J. ; RINO, J. ; CARVALHO, C. ; TAVANEZ, J. P. ; WAHLE, E. ; ROSA, A. C. ; CARMO-FONSECA, M.: The intranuclear mobility of messenger RNA binding proteins is ATP dependent and temperature sensitive. In: *The Journal of Cell Biology* 159 (2002), Dezember, Nr. 5, S. 795–805
- [Cantor und Schimmel 1980] CANTOR, C. R. ; SCHIMMEL, P. R.: Fluorescence Spectroscopy. In: *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman San Francisco, 1980, S. 433–465
- [Carrero et al. 2003] CARRERO, G. ; McDONALD, D. ; CRAWFORD, E. ; VRIES, G. de ; HENDZEL, M. J.: Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins. In: *Methods* 29 (2003), Januar, Nr. 1, S. 14–28
- [Chalfie et al. 1994] CHALFIE, M. ; TU, Y. ; EUSKIRCHEN, G. ; WARD, W. W. ; PRASHER, D. C.: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. In: *Science* 263 (1994), Februar, Nr. 5148, S. 802–805
- [Chan et al. 2011] CHAN, F. T. S. ; KAMINSKI, C. F. ; SCHIERLE, G. S. K.: HomoFRET Fluorescence Anisotropy Imaging as a Tool to Study Molecular Self-Assembly in Live Cells. In: *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* 12 (2011), Februar, Nr. 3, S. 500–509
- [Chapman und Jackson 2008] CHAPMAN, J. R. ; JACKSON, S. P.: Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. In: *EMBO Reports* 9 (2008), August, Nr. 8, S. 795–801
- [Chen et al. 2007] CHEN, B. P. C. ; UEMATSU, N. ; KOBAYASHI, J. ; LERENTHAL, Y. ; KREMPLE, A. ; YAJIMA, H. ; LÖBRICH, M. ; SHILOH, Y. ; CHEN, D. J.: Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. In: *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2007), März, Nr. 9, S. 6582–6587
- [Christmann et al. 2003] CHRISTMANN, M. ; TOMICIC, M. T. ; ROOS, W. P. ; KAINA, B.: Mechanisms of human DNA repair: an update. In: *Toxicology* 193 (2003), November, Nr. 1-2, S. 3–34
- [Chroma 2011] CHROMA: *HQ525/50m.* 2011. – URL <http://www.chroma.com/products/part/430>. – Zugriffsdatum: 05.11.2011
- [Cimprich und Cortez 2008] CIMPRICH, K. A. ; CORTEZ, D.: ATR: an essential regulator of genome integrity. In: *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (2008), August, Nr. 8,

S. 616–627

- [Clegg 2009] CLEGG, R. M.: Chapter 1 Förster resonance energy transfer - FRET what is it, why do it, and how it's done. In: GADELLA, T. W. J. (Hrsg.): *Fret and Flim Techniques* Bd. Volume 33. Elsevier, 2009, S. 1–57
- [Cormack et al. 1996] CORMACK, B. P. ; VALDIVIA, R. H. ; FALKOW, S.: FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). In: *Gene* 173 (1996), Nr. 1 Spec No, S. 33–38
- [Cortez et al. 2001] CORTEZ, D. ; GUNTUKU, S. ; QIN, J. ; ELLEDGE, S. J.: ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. In: *Science* 294 (2001), November, Nr. 5547, S. 1713–1716
- [Coster und Goldberg 2010] COSTER, G. ; GOLDBERG, M.: The cellular response to DNA damage: A focus on MDC1 and its interacting proteins. In: *Nucleus* 1 (2010), März, Nr. 2, S. 166–178
- [Crank 1975] CRANK, J. ; 2 (Hrsg.): *The Mathematics of Diffusion*. Oxford at the Clarendon Press, 1975
- [Dale et al. 1979] DALE, R. E. ; EISINGER, J. ; BLUMBERG, W. E.: The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. In: *Biophysical Journal* 26 (1979), Mai, Nr. 2, S. 161–193
- [Dayel 1999] DAYEL, M.: Diffusion of Green Fluorescent Protein in the Aqueous-Phase Lumen of Endoplasmic Reticulum. In: *Biophysical Journal* 76 (1999), Nr. 5, S. 2843–2851
- [Delacroix et al. 2007] DELACROIX, S. ; WAGNER, J. M. ; KOBAYASHI, M. ; YAMAMOTO, K.-i. ; KARNITZ, L. M.: The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. In: *Genes & Development* 21 (2007), Juni, Nr. 12, S. 1472–1477
- [Dix und Verkman 2008] DIX, J. A. ; VERKMAN, A. S.: Crowding effects on diffusion in solutions and cells. In: *Annual Review of Biophysics* 37 (2008), S. 247–263
- [Doil et al. 2009] DOIL, C. ; MAILAND, N. ; BEKKER-JENSEN, S. ; MENARD, P. ; LARSEN, D. H. ; PEPPERKOK, R. ; ELLENBERG, J. ; PANIER, S. ; DUROCHER, D. ; BARTEK, J. ; LUKAS, J. ; LUKAS, C.: RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. In: *Cell* 136 (2009), Februar, Nr. 3, S. 435–446
- [Dross et al. 2009] DROSS, N. ; SPRIET, C. ; ZWERGER, M. ; MÜLLER, G. ; WALDECK, W. ; LANGOWSKI, J.: Mapping eGFP oligomer mobility in living cell nuclei. In: *PloS One* 4 (2009), April, Nr. 4, S. e5041
- [Dundr et al. 2002] DUNDR, M. ; HOFFMANN-ROHRER, U. ; HU, Q. ; GRUMMT, I. ; ROTHBLUM, L. I. ; PHAIR, R. D. ; MISTELI, T.: A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase in vivo. In: *Science* 298 (2002), November, Nr. 5598, S. 1623–1626
- [Eckstein 1998] ECKSTEIN, F.: *DNA Repair*. 1. Springer-Verlag New York, Inc, November 1998
- [Edidin et al. 1976] EDIDIN, M. ; ZAGYANSKY, Y. ; LARDNER, T. J.: Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. In: *Science* 191 (1976), Februar, Nr. 4226, S. 466–468
- [Eliezer et al. 2009] ELIEZER, Y. ; ARGAMAN, L. ; RHIE, A. ; DOHERTY, A. J. ; GOLDBERG, M.: The direct interaction between 53BP1 and MDC1 is required for the recruitment of 53BP1 to sites of damage. In: *The Journal of Biological Chemistry* 284 (2009), Januar, Nr. 1, S. 426–435
- [Ellenberg et al. 1997] ELLENBERG, J. ; SIGGIA, E. D. ; MOREIRA, J. E. ; SMITH, C. L. ;

- PRESLEY, J. F. ; WORMAN, H. J. ; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.: Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. In: *The Journal of Cell Biology* 138 (1997), September, Nr. 6, S. 1193–1206
- [Essers et al. 2002] ESSERS, J. ; HOUTSMULLER, A. B. ; VEELLEN, L. van ; PAULUSMA, C. ; NIGG, A. L. ; PASTINK, A. ; VERMEULEN, W. ; HOEIJMAKERS, J. H. J. ; KANAAR, R.: Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage. In: *The EMBO Journal* 21 (2002), April, Nr. 8, S. 2030–2037
- [Falck et al. 2005] FALCK, J. ; COATES, J. ; JACKSON, S. P.: Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. In: *Nature* 434 (2005), März, Nr. 7033, S. 605–611
- [FitzGerald et al. 2009] FITZGERALD, J. E. ; GRENON, M. ; LOWNDES, N. F.: 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment. In: *Biochemical Society Transactions* 37 (2009), August, Nr. Pt 4, S. 897–904
- [Förster 1948] FÖRSTER, T.: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In: *Annalen der Physik* 437 (1948), Nr. 1-2, S. 55–75
- [Förster 1965a] FÖRSTER, T.: Delocalized excitation and excitation transfer. In: SINANOGLUR, O. (Hrsg.): *Modern Quantum Chemistry Istanbul Lectures*. Academic Press New York and London, 1965, Kap. III. B Light and Organic Crystals, S. 93–137
- [Förster 1965b] FÖRSTER, T.: Polarisationspektren der Photolumineszenz in Isotroper Lösung. In: *Pure and Applied Chemistry* 11 (1965), Nr. 3–4, S. 287–296
- [Gautier et al. 2001] GAUTIER, I. ; TRAMIER, M. ; DURIEUX, C. ; COPPEY, J. ; PANSU, R. B. ; NICOLAS, J. C. ; KEMNITZ, K. ; COPPEY-MOISAN, M.: Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins. In: *Biophysical Journal* 80 (2001), Juni, Nr. 6, S. 3000–3008
- [Gorman et al. 2007] GORMAN, J. ; CHOWDHURY, A. ; SURTEES, J. A. ; SHIMADA, J. ; REICHMAN, D. R. ; ALANI, E. ; GREENE, E. C.: Dynamic basis for one-dimensional DNA scanning by the mismatch repair complex Msh2-Msh6. In: *Molecular Cell* 28 (2007), November, Nr. 3, S. 359–370
- [Granéli et al. 2006] GRANÉLI, A. ; YEYKAL, C. C. ; ROBERTSON, R. B. ; GREENE, E. C.: Long-distance lateral diffusion of human Rad51 on double-stranded DNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006), Januar, Nr. 5, S. 1221–1226
- [Görisch et al. 2005] GÖRISCH, S. M. ; LICHTER, P. ; RIPPE, K.: Mobility of multi-subunit complexes in the nucleus: accessibility and dynamics of chromatin subcompartments. In: *Histochemistry and Cell Biology* 123 (2005), März, Nr. 3, S. 217–228
- [Gryczynski et al. 1995] GRYCZYNSKI, I. ; MALAK, H. ; LAKOWICZ, J. R.: Three-photon induced fluorescence of 2,5-diphenyloxazole with a femtosecond Ti:sapphire laser. In: *Chemical Physics Letters* 245 (1995), Oktober, Nr. 1, S. 30–35
- [Haberer et al. 1993] HABERER, T. ; BECHER, W. ; SCHARDT, D. ; KRAFT, G.: Magnetic scanning system for heavy ion therapy. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 330 (1993), Juni, Nr. 1–2, S. 296–305

- [Hall und Giaccia 2006] HALL, E. J. ; GIACCIA, A. J.: *Radiobiology for the radiologist*. Lip-pincott Williams & Wilkins, 2006
- [Hari et al. 2010] HARI, F. J. ; SPYCHER, C. ; JUNGMICHEL, S. ; PAVIC, L. ; STUCKI, M.: A divalent FHA/BRCT-binding mechanism couples the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. In: *EMBO Reports* 11 (2010), Mai, Nr. 5, S. 387–392
- [Heilmann et al. 1996] HEILMANN, J. ; TAUCHER-SCHOLZ, G. ; HABERER, T. ; SCHOLZ, M. ; KRAFT, G.: Measurement of intracellular dna double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water. In: *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 34 (1996), Februar, Nr. 3, S. 599–608
- [Heiss et al. 2006] HEISS, M. ; FISCHER, B. E. ; JAKOB, B. ; FOURNIER, C. ; BECKER, G. ; TAUCHER-SCHOLZ, G.: Targeted irradiation of Mammalian cells using a heavy-ion microprobe. In: *Radiation Research* 165 (2006), Februar, Nr. 2, S. 231–239
- [Herman et al. 2011] HERMAN, B. ; FROHLICH, V. E. C. ; LAKOWICZ, J. R. ; FELLERS, T. J. ; DAVIDSON, M. W.: *Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy*. 2011. – URL <http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>. – Zugriffsdatum: 12.09.2011
- [Hickson et al. 2004] HICKSON, I. ; ZHAO, Y. ; RICHARDSON, C. J. ; GREEN, S. J. ; MARTIN, N. M. B. ; ORR, A. I. ; REAPER, P. M. ; JACKSON, S. P. ; CURTIN, N. J. ; SMITH, G. C. M.: Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. In: *Cancer Research* 64 (2004), Dezember, Nr. 24, S. 9152–9159
- [Hinow et al. 2006] HINOW, P. ; ROGERS, C. E. ; BARBIERI, C. E. ; PIETENPOL, J. A. ; KENWORTHY, A. K. ; DiBENEDETTO, E.: The DNA binding activity of p53 displays reaction-diffusion kinetics. In: *Biophysical Journal* 91 (2006), Juli, Nr. 1, S. 330–342
- [Hopfner et al. 2001] HOPFNER, K. P. ; KARCHER, A. ; CRAIG, L. ; WOO, T. T. ; CARNEY, J. P. ; TAINER, J. A.: Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. In: *Cell* 105 (2001), Mai, Nr. 4, S. 473–485
- [Hopfner et al. 2002] HOPFNER, K.-P. ; CRAIG, L. ; MONCALIAN, G. ; ZINKEL, R. A. ; USUI, T. ; OWEN, B. A. L. ; KARCHER, A. ; HENDERSON, B. ; BODMER, J.-L. ; McMURRAY, C. T. ; CARNEY, J. P. ; PETRINI, J. H. J. ; TAINER, J. A.: The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. In: *Nature* 418 (2002), August, Nr. 6897, S. 562–566
- [Houtsmuller et al. 1999] HOUTSMULLER, A. B. ; RADEMAKERS, S. ; NIGG, A. L. ; HOOGSTRATEN, D. ; HOEIJMAKERS, J. H. ; VERMEULEN, W.: Action of DNA repair endonuclease ER-CC1/XPF in living cells. In: *Science* 284 (1999), Mai, Nr. 5416, S. 958–961
- [Houtsmuller 2005] HOUTSMULLER, A. B.: Fluorescence recovery after photobleaching: application to nuclear proteins. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 95 (2005), S. 177–199
- [Huen et al. 2007] HUEN, M. S. Y. ; GRANT, R. ; MANKE, I. ; MINN, K. ; YU, X. ; YAFFE, M. B. ; CHEN, J.: RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. In: *Cell* 131 (2007), November, Nr. 5, S. 901–914
- [Huyen et al. 2004] HUYEN, Y. ; ZGHEIB, O. ; DITULLIO, J. ; GORGOLIS, V. G. ; ZACHARATOS,

- P. ; PETTY, T. J. ; SHESTON, E. A. ; MELLERT, H. S. ; STAVRIDIS, E. S. ; HALAZONETIS, T. D.: Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. In: *Nature* 432 (2004), November, Nr. 7015, S. 406–411
- [ICRU 1970] ICRU: *Linear Energy Transfer ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements) Report 16*. ICRU Publications, Juni 1970
- [ICRU 1984] ICRU: *Stopping Powers for Electrons and Positrons ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements) Report 37*. ICRU Publications, 1984
- [ICRU 1993] ICRU: *Stopping Powers and Ranges for Protons and Alpha Particles ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements) Report 49*. ICRU Publications, 1993
- [Inami und Kawata 2000] INAMI, W. ; KAWATA, Y.: Three-Dimensional Imaging Analysis of Confocal and Conventional Polarization Microscopes By Use of Mie Scattering Theory. In: *Applied Optics* 39 (2000), Dezember, Nr. 34, S. 6369–6373
- [Inouye und Tsuji 1994] INOUE, S. ; TSUJI, F. I.: Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. In: *FEBS Letters* 341 (1994), März, Nr. 2-3, S. 277–280
- [Invitrogen 2011a] INVITROGEN: *CFP Spektrum*. 2011. – URL <http://probes.invitrogen.com/media/spectra/data/CFPp74.txt>. – Zugriffsdatum: 02.11.2011
- [Invitrogen 2011b] INVITROGEN: *YFP Spektrum*. 2011. – URL <http://probes.invitrogen.com/media/spectra/data/tpzFP.txt>. – Zugriffsdatum: 02.11.2011
- [Jablonski 1960] JABLONSKI, A.: On the Notion of Emission Anisotropy. In: *Bulletin de L'Academie Polonaise des Science* VIII (1960), Nr. 4, S. 259–264
- [Jacquemont und Taniguchi 2007] JACQUEMONT, C. ; TANIGUCHI, T.: Proteasome function is required for DNA damage response and fanconi anemia pathway activation. In: *Cancer Research* 67 (2007), August, Nr. 15, S. 7395–7405
- [Jakob et al. 2005] JAKOB, B. ; RUDOLPH, J. H. ; GUEVEN, N. ; LAVIN, M. F. ; TAUCHER-SCHOLZ, G.: Live cell imaging of heavy-ion-induced radiation responses by beamline microscopy. In: *Radiation Research* 163 (2005), Juni, Nr. 6, S. 681–690
- [Jakob und Taucher-Scholz 2006] JAKOB, B. ; TAUCHER-SCHOLZ, G.: Interaction of heavy ions with nuclear chromatin: Spatiotemporal investigations of biological responses in a cellular environment. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 245 (2006), April, Nr. 1, S. 292–297
- [Jares-Erijman und Jovin 2003] JARES-ERIJMAN, E. A. ; JOVIN, T. M.: FRET imaging. In: *Nature Biotechnology* 21 (2003), November, Nr. 11, S. 1387–1395
- [Jazayeri et al. 2006] JAZAYERI, A. ; FALCK, J. ; LUKAS, C. ; BARTEK, J. ; SMITH, G. C. M. ; LUKAS, J. ; JACKSON, S. P.: ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. In: *Nature Cell Biology* 8 (2006), Nr. 1, S. 37–45
- [Johnson und Davidson 2011] JOHNSON, I. D. ; DAVIDSON, M. W.: *Jablonski Energy Diagram*. 2011. – URL

- <http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/jabintro/index.html>. – Zugriffsdatum: 12.09.2011
- [Jungmichel und Stucki 2010] JUNGMICHEL, S. ; STUCKI, M.: MDC1: The art of keeping things in focus. In: *Chromosoma* 119 (2010), August, Nr. 4, S. 337–349
- [Kao et al. 1993] KAO, H. P. ; ABNEY, J. R. ; VERKMAN, A. S.: Determinants of the translational mobility of a small solute in cell cytoplasm. In: *The Journal of Cell Biology* 120 (1993), Januar, Nr. 1, S. 175–184
- [Karp 2005] KARP, G.: *Molekulare Zellbiologie*. 1. Springer Berlin Heidelberg, 2005
- [Kühn et al. 2011] KÜHN, T. ; IHALAINEN, T. O. ; HYVÄLUOMA, J. ; DROSS, N. ; WILLMAN, S. F. ; LANGOWSKI, J. ; VIHINEN-RANTA, M. ; TIMONEN, J.: Protein diffusion in Mammalian cell cytoplasm. In: *PLoS One* 6 (2011), August, Nr. 8, S. e22962
- [Kiefer und Straaten 1986] KIEFER, J. ; STRAATEN, H.: A model of ion track structure based on classical collision dynamics (radiobiology application). In: *Physics in Medicine and Biology* 31 (1986), November, S. 1201–1209
- [Klonis et al. 2002] KLONIS, N. ; RUG, M. ; HARPER, I. ; WICKHAM, M. ; COWMAN, A. ; TILLEY, L.: Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics. In: *European Biophysics Journal: EBJ* 31 (2002), März, Nr. 1, S. 36–51
- [Kolas et al. 2007] KOLAS, N. K. ; CHAPMAN, J. R. ; NAKADA, S. ; YLANKO, J. ; CHAHWAN, R. ; SWEENEY, F. D. ; PANIER, S. ; MENDEZ, M. ; WILDENHAIN, J. ; THOMSON, T. M. ; PELLETIER, L. ; JACKSON, S. P. ; DUROCHER, D.: Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. In: *Science* 318 (2007), Dezember, Nr. 5856, S. 1637–1640
- [Koushik et al. 2006] KOUSHIK, S. V. ; CHEN, H. ; THALER, C. ; PUHL, H. L. ; VOGEL, S. S.: Cerulean, Venus, and VenusY67C FRET reference standards. In: *Biophysical Journal* 91 (2006), Dezember, Nr. 12, S. L99–L101
- [Kozlov et al. 2011] KOZLOV, S. V. ; GRAHAM, M. E. ; JAKOB, B. ; TOBIAS, F. ; KIJAS, A. W. ; TANUJI, M. ; CHEN, P. ; ROBINSON, P. J. ; TAUCHER-SCHOLZ, G. ; SUZUKI, K. ; SO, S. ; CHEN, D. ; LAVIN, M. F.: Autophosphorylation and ATM Activation: Additional sites add to the complexity. In: *The Journal of Biological Chemistry* 286 (2011), März, Nr. 11, S. 9107–9119
- [Kozlov et al. 2006] KOZLOV, S. V. ; GRAHAM, M. E. ; PENG, C. ; CHEN, P. ; ROBINSON, P. J. ; LAVIN, M. F.: Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. In: *The EMBO Journal* 25 (2006), August, Nr. 15, S. 3504–3514
- [Kraft 1999] KRAFT, G.: RBE and its interpretation. In: *Strahlentherapie Und Onkologie* 175 (1999), Juni, Nr. Suppl II, S. 44–47
- [Kraft 2000] KRAFT, G.: Tumor Therapy with Heavy Charged Particles. In: *Progress in Particle and Nuclear Physics* 45 (2000), S. 473–544
- [Kraft 2008] KRAFT, G.: *Tumorthherapie mit schweren Ionen, Physikalische und biologische Grundlagen, Technische Realisierung an der GSI, Klinische Ergebnisse*. Frotcher Druck GmbH. 2008
- [Kremers et al. 2011] KREMERS, G.-J. ; PISTON, D. W. ; DAVIDSON, M. W.: *Fundamental Principles of Förster Resonance Energy Trans-*

- fer (FRET) Microscopy with Fluorescent Proteins.* 2011. – URL <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fret/fretintro.html>. – Zugriffsdatum: 14.09.2011
- [Krämer und Durante 2010] KRÄMER, M. ; DURANTE, M.: Ion beam transport calculations and treatment plans in particle therapy. In: *The European Physical Journal D* 60 (2010), März, S. 195–202
- [Krämer und Kraft 1994] KRÄMER, M. ; KRAFT, G.: Calculations of heavy-ion track structure. In: *Radiation and Environmental Biophysics* 33 (1994), Nr. 2, S. 91–109
- [Kumagai et al. 2006] KUMAGAI, A. ; LEE, J. ; YOO, H. Y. ; DUNPHY, W. G.: TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. In: *Cell* 124 (2006), März, Nr. 5, S. 943–955
- [Lakowicz et al. 1992] LAKOWICZ, J. R. ; GRZYCZYNSKI, I. ; GRZYCZYNSKI, Z. ; DANIELSEN, E. ; WIRTH, M. J.: Time-resolved fluorescence intensity and anisotropy decays of 2,5-diphenyloxazole by two-photon excitation and frequency-domain fluorometry. In: *The Journal of Physical Chemistry* 96 (1992), April, Nr. 7, S. 3000–3006
- [Lakowicz et al. 1979] LAKOWICZ, J. R. ; PRENDERGAST, F. G. ; HOGAN, D.: Differential polarized phase fluorometric investigations of diphenylhexatriene in lipid bilayers. Quantitation of hindered depolarizing rotations. In: *Biochemistry* 18 (1979), Februar, Nr. 3, S. 508–519
- [Lambert 2009] LAMBERT, N. A.: Uncoupling diffusion and binding in FRAP experiments. In: *Nature Methods* 6 (2009), März, Nr. 3, S. 183–184
- [Laser2000 2011] LASER2000: *Semrock FilterFinder FF01-475/50-25.* 2011. – URL <http://www.laser2000.de/index.php?action=product&pid=FF01-475/50-25&id=364176>. – Zugriffsdatum: 05.11.2011
- [Lee und Paull 2005] LEE, J.-H. ; PAULL, T. T.: ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. In: *Science* 308 (2005), April, Nr. 5721, S. 551–554
- [Levitt et al. 2009] LEVITT, J. A. ; MATTHEWS, D. R. ; AMEER-BEG, S. M. ; SUHLING, K.: Fluorescence lifetime and polarization-resolved imaging in cell biology. In: *Current Opinion in Biotechnology* 20 (2009), Februar, Nr. 1, S. 28–36
- [Li und Cucinotta 2011] LI, Y. ; CUCINOTTA, F. A.: Modeling non-homologous end joining. In: *Journal of Theoretical Biology* 283 (2011), August, Nr. 1, S. 122–135
- [Lide 1990] LIDE, D. R.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics.* 70. CRC Press, 1990
- [Lidke et al. 2003] LIDKE, D. S. ; NAGY, P. ; BARISAS, B. G. ; HEINTZMANN, R. ; POST, J. N. ; LIDKE, K. A. ; CLAYTON, A. H. A. ; ARNDT-JOVIN, D. J. ; JOVIN, T. M.: Imaging molecular interactions in cells by dynamic and static fluorescence anisotropy (rFLIM and emFRET). In: *Biochemical Society Transactions* 31 (2003), Oktober, Nr. Pt 5, S. 1020–1027
- [Lippincott-Schwartz et al. 2001] LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. ; SNAPP, E. ; KENWORTHY, A.: Studying protein dynamics in living cells. In: *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (2001), Juni, Nr. 6, S. 444–456
- [Lloyd et al. 2009] LLOYD, J. ; CHAPMAN, J. R. ; CLAPPERTON, J. A. ; HAIRE, L. F. ; HARTSUIKER, E. ; LI, J. ; CARR, A. M. ; JACKSON, S. P. ; SMERDON, S. J.: A supramolecular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage. In: *Cell* 139 (2009), Oktober, Nr. 1, S. 100–111

- [Llères et al. 2009] LLÈRES, D. ; JAMES, J. ; SWIFT, S. ; NORMAN, D. G. ; LAMOND, A. I.: Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM-FRET. In: *The Journal of Cell Biology* 187 (2009), November, Nr. 4, S. 481–496
- [Lou et al. 2006] LOU, Z. ; MINTER-DYKHOUSE, K. ; FRANCO, S. ; GOSTISSA, M. ; RIVERA, M. A. ; CELESTE, A. ; MANIS, J. P. ; DEURSEN, J. van ; NUSSENZWEIG, A. ; PAULL, T. T. ; ALT, F. W. ; CHEN, J.: MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. In: *Molecular Cell* 21 (2006), Januar, Nr. 2, S. 187–200
- [Lovejoy und Cortez 2009] LOVEJOY, C. A. ; CORTEZ, D.: Common mechanisms of PIKK regulation. In: *DNA Repair* 8 (2009), September, Nr. 9, S. 1004–1008
- [Lubelski und Klafter 2008] LUBELSKI, A. ; KLAFTER, J.: Fluorescence recovery after photobleaching: the case of anomalous diffusion. In: *Biophysical Journal* 94 (2008), Juni, Nr. 12, S. 4646–4653
- [Luby-Phelps et al. 1987] LUBY-PHELPS, K. ; CASTLE, P. E. ; TAYLOR, D. L. ; LANNI, F.: Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (1987), Juli, Nr. 14, S. 4910–4913
- [Luby-Phelps et al. 1986] LUBY-PHELPS, K. ; TAYLOR, D. L. ; LANNI, F.: Probing the structure of cytoplasm. In: *The Journal of Cell Biology* 102 (1986), Juni, Nr. 6, S. 2015–2022
- [Luisier et al. 2010] LUISIER, F. ; VONESCH, C. ; BLU, T. ; UNSER, M.: Fast Interscale Wavelet Denoising of Poisson-Corrupted Images. In: *Signal Processing* 90 (2010), Februar, Nr. 2, S. 415–427
- [Lukacs et al. 2000] LUKACS, G. L. ; HAGGIE, P. ; SEKSEK, O. ; LECHARDEUR, D. ; FREEDMAN, N. ; VERKMAN, A. S.: Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), Januar, Nr. 3, S. 1625–1629
- [Lukas et al. 2005] LUKAS, C. ; BARTEK, J. ; LUKAS, J.: Imaging of protein movement induced by chromosomal breakage: tiny 'local' lesions pose great 'global' challenges. In: *Chromosoma* 114 (2005), August, Nr. 3, S. 146–154
- [Lukas et al. 2003] LUKAS, C. ; FALCK, J. ; BARTKOVA, J. ; BARTEK, J. ; LUKAS, J.: Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. In: *Nature Cell Biology* 5 (2003), März, Nr. 3, S. 255–260
- [Lukas et al. 2004] LUKAS, C. ; MELANDER, F. ; STUCKI, M. ; FALCK, J. ; BEKKER-JENSEN, S. ; GOLDBERG, M. ; LERENTHAL, Y. ; JACKSON, S. P. ; BARTEK, J. ; LUKAS, J.: Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. In: *The EMBO Journal* 23 (2004), Juli, Nr. 13, S. 2674–2683
- [Lukas et al. 2011] LUKAS, J. ; LUKAS, C. ; BARTEK, J.: More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. In: *Nat Cell Biol* 13 (2011), Oktober, Nr. 10, S. 1161–1169
- [Mailand et al. 2007] MAILAND, N. ; BEKKER-JENSEN, S. ; FAUSTRUP, H. ; MELANDER, F. ; BARTEK, J. ; LUKAS, C. ; LUKAS, J.: RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. In: *Cell* 131 (2007), November, Nr. 5, S. 887–900

- [Makrigiorgos und Waker 1986] MAKRIGIORGOS, G. ; WAKER, A. J.: Measurement of the restricted LET of photon sources (5 keV-1.2 MeV) by the recombination method: theory and practice. In: *Physics in Medicine and Biology* 31 (1986), Mai, S. 543–554
- [McNally 2008] McNALLY, J. G.: Quantitative FRAP in analysis of molecular binding dynamics in vivo. In: *Methods in Cell Biology* 85 (2008), S. 329–351
- [Melandar et al. 2008] MELANDER, F. ; BEKKER-JENSEN, S. ; FALCK, J. ; BARTEK, J. ; MAILAND, N. ; LUKAS, J.: Phosphorylation of SDT repeats in the MDC1 N terminus triggers retention of NBS1 at the DNA damage-modified chromatin. In: *The Journal of Cell Biology* 181 (2008), April, Nr. 2, S. 213–226
- [Merk et al. 2010] MERK, B. ; FISCHER, B. ; NEUMANN, R. ; TOBIAS, F. ; VOSS, K.-O.: Contrast enhancement for in-situ GFP microscopy at the microbeam. In: *GSI Scientific Report 2009* (2010), Juni, S. 457
- [Meyer 2011] MEYER, B.: 2011. – persönliche Kommunikation
- [Michaelis und Menten 1913] MICHAELIS, L. ; MENTEN, M. L.: Die Kinetik der Invertinwirkung. In: *Biochem. Z.* 49 (1913), S. 333–369
- [Michelman-Ribeiro et al. 2009] MICHELMAN-RIBEIRO, A. ; MAZZA, D. ; ROSALES, T. ; STASEVICH, T. J. ; BOUKARI, H. ; RISHI, V. ; VINSON, C. ; KNUTSON, J. R. ; McNALLY, J. G.: Direct measurement of association and dissociation rates of DNA binding in live cells by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Biophysical Journal* 97 (2009), Juli, Nr. 1, S. 337–346
- [Mordes et al. 2008] MORDES, D. A. ; GLICK, G. G. ; ZHAO, R. ; CORTEZ, D.: TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. In: *Genes & Development* 22 (2008), Juni, Nr. 11, S. 1478–1489
- [Mosconi et al. 2011] MOSCONI, M. ; GIESEN, U. ; LANGNER, F. ; MIELKE, C. ; DALLA ROSA, I. ; DIRKS, W. G.: 53BP1 and MDC1 foci formation in HT-1080 cells for low- and high-LET microbeam irradiations. In: *Radiation and Environmental Biophysics* 50 (2011), August, Nr. 3, S. 345–352
- [Mueller et al. 2010] MUELLER, F. ; MAZZA, D. ; STASEVICH, T. J. ; McNALLY, J. G.: FRAP and kinetic modeling in the analysis of nuclear protein dynamics: what do we really know? In: *Current Opinion in Cell Biology* 22 (2010), Juni, Nr. 3, S. 403–411
- [Mueller et al. 2008] MUELLER, F. ; WACH, P. ; McNALLY, J. G.: Evidence for a common mode of transcription factor interaction with chromatin as revealed by improved quantitative fluorescence recovery after photobleaching. In: *Biophysical Journal* 94 (2008), April, Nr. 8, S. 3323–3339
- [Nagai et al. 2002] NAGAI, T. ; IBATA, K. ; PARK, E. S. ; KUBOTA, M. ; MIKOSHIBA, K. ; MIYAWAKI, A.: A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. In: *Nature Biotechnology* 20 (2002), Januar, Nr. 1, S. 87–90
- [Nam und Cortez 2011] NAM, E. A. ; CORTEZ, D.: ATR signalling: more than meeting at the fork. In: *The Biochemical Journal* 436 (2011), Juni, Nr. 3, S. 527–536
- [Nikon 2011] NIKON: *B-2E/C FITC Filterwürfel mit Anregungsfilter 465-495 und dichroitischem Spiegel 505 LP.* 2011. – URL <http://www.microscopyu.com/tutorials/flash/spectralprofiles/index.html>. – Zugriffsdatum: 04.11.2011

- [Olson et al. 2007] OLSON, E. ; NIEVERA, C. J. ; LEE, A. Y.-L. ; CHEN, L. ; WU, X.: The Mre11-Rad50-Nbs1 complex acts both upstream and downstream of ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related protein (ATR) to regulate the S-phase checkpoint following UV treatment. In: *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2007), August, Nr. 31, S. 22939–22952
- [Olympus 2011a] OLYMPUS: *U-MNB2 Filterwürfel mit Filter BP 470-490*. 2011. – URL http://microscope.olympus-global.com/uis2/en/u_mnb2/. – Zugriffsdatum: 04.11.2011
- [Olympus 2011b] OLYMPUS: *U-MSWG2 Filterwürfel mit Filter BA590*. 2011. – URL http://microscope.olympus-global.com/uis2/en/u_mswg2/. – Zugriffsdatum: 04.11.2011
- [OptoSigma-Corporation 2011] OPTOSIGMA-CORPORATION: *Spektrum des 069-0110, 0120 Polarisators*. Auf direkte Anfrage vom 21.04.2010. 2011
- [Ormö et al. 1996] ORMÖ, M. ; CUBITT, A. B. ; KALLIO, K. ; GROSS, L. A. ; TSIEN, R. Y. ; REMINGTON, S. J.: Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. In: *Science* 273 (1996), September, Nr. 5280, S. 1392–1395
- [Pack et al. 2006] PACK, C. ; SAITO, K. ; TAMURA, M. ; KINJO, M.: Microenvironment and effect of energy depletion in the nucleus analyzed by mobility of multiple oligomeric EGFPs. In: *Biophysical Journal* 91 (2006), November, Nr. 10, S. 3921–3936
- [Paull und Gellert 1998] PAULL, T. T. ; GELLERT, M.: The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. In: *Molecular Cell* 1 (1998), Juni, Nr. 7, S. 969–979
- [Phair und Misteli 2000] PHAIR, R. D. ; MISTELI, T.: High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. In: *Nature* 404 (2000), April, Nr. 6778, S. 604–609
- [Phair et al. 2004a] PHAIR, R. D. ; GORSKI, S. A. ; MISTELI, T.: Measurement of dynamic protein binding to chromatin in vivo, using photobleaching microscopy. In: *Methods in Enzymology* 375 (2004), S. 393–414
- [Phair et al. 2004b] PHAIR, R. D. ; SCAFFIDI, P. ; ELBI, C. ; VECEROVÁ, J. ; DEY, A. ; OZATO, K. ; BROWN, D. T. ; HAGER, G. ; BUSTIN, M. ; MISTELI, T.: Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins. In: *Molecular and Cellular Biology* 24 (2004), Juli, Nr. 14, S. 6393–402
- [Piston und Kremers 2007] PISTON, D. W. ; KREMERS, G.: Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. In: *Trends in Biochemical Sciences* 32 (2007), September, Nr. 9, S. 407–414
- [Piston und Rizzo 2008] PISTON, D. W. ; RIZZO, M. A.: FRET by fluorescence polarization microscopy. In: *Methods in Cell Biology* 85 (2008), S. 415–430
- [Polo und Jackson 2011] POLO, S. E. ; JACKSON, S. P.: Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. In: *Genes & Development* 25 (2011), März, Nr. 5, S. 409–433
- [Poo und Cone 1973] POO, M. ; CONE, R. A.: Lateral diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane. In: *Journal of Supramolecular Structure* 1 (1973), Nr. 4, S. 354
- [Poo und Cone 1974] POO, M. ; CONE, R. A.: Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. In: *Nature* 247 (1974), Februar, Nr. 441, S. 438–441

- [Prasher et al. 1992] PRASHER, D. C. ; ECKENRODE, V. K. ; WARD, W. W. ; PRENDERGAST, F. G. ; CORMIER, M. J.: Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. In: *Gene* 111 (1992), Februar, Nr. 2, S. 229–233
- [Rizzo und Piston 2005] RIZZO, M. A. ; PISTON, D. W.: High-contrast imaging of fluorescent protein FRET by fluorescence polarization microscopy. In: *Biophysical Journal* 88 (2005), Februar, Nr. 2, S. L14–16
- [Rizzo et al. 2004] RIZZO, M. A. ; SPRINGER, G. H. ; GRANADA, B. ; PISTON, D. W.: An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. In: *Nature Biotechnology* 22 (2004), April, Nr. 4, S. 445–449
- [Rodgers et al. 2002] RODGERS, W. ; JORDAN, S. J. ; CAPRA, J. D.: Transient association of Ku with nuclear substrates characterized using fluorescence photobleaching. In: *Journal of Immunology* 168 (2002), März, Nr. 5, S. 2348–2355
- [Rogakou et al. 1999] ROGAKOU, E. P. ; BOON, C. ; REDON, C. ; BONNER, W. M.: Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. In: *The Journal of Cell Biology* 146 (1999), September, Nr. 5, S. 905–916
- [Rogakou et al. 1998] ROGAKOU, E. P. ; PILCH, D. R. ; ORR, A. H. ; IVANOVA, V. S. ; BONNER, W. M.: DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. In: *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), März, Nr. 10, S. 5858–5868
- [van Royen et al. 2009] ROYEN, M. E. van ; FARLA, P. ; MATTERN, K. A. ; GEVERTS, B. ; TRAPMAN, J. ; HOUTSMULLERGREEN, A. B.: Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) to Study Nuclear Protein Dynamics in Living Cells. In: *Methods in Molecular Biology* 464 (2009), S. 363–385
- [van Royen et al. 2011] ROYEN, M. E. van ; ZOTTER, A. ; IBRAHIM, S. M. ; GEVERTS, B. ; HOUTSMULLER, A. B.: Nuclear proteins: finding and binding target sites in chromatin. In: *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 19 (2011), Januar, Nr. 1, S. 83–98
- [Rübe et al. 2011] RÜBE, C. E. ; LORAT, Y. ; SCHULER, N. ; SCHANZ, S. ; WENNEMUTH, G. ; RÜBE, C.: DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. In: *DNA Repair* 10 (2011), April, Nr. 4, S. 427–437
- [Sarkar et al. 2009] SARKAR, P. ; Koushik, S. V. ; VOGEL, S. S. ; GRYCZYNSKI, I. ; GRYCZYNSKI, Z.: Photophysical properties of Cerulean and Venus fluorescent proteins. In: *Journal of Biomedical Optics* 14 (2009), Juni, Nr. 3, S. 034047
- [Schmidt et al. 2005] SCHMIDT, R. ; LANG, F. ; THEWS, G.: *Physiologie des Menschen*. 29. Springer Berlin Heidelberg, 2005
- [Scholz 2003] SCHOLZ, M.: *Radiation Effects on Polymers for Biological Use*. Kap. Effects of Ion Radiation on Cells and Tissues, S. 158, Springer, April 2003
- [Seksek et al. 1997] SEKSEK, O. ; BIWERSI, J. ; VERKMAN, A. S.: Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. In: *The Journal of Cell Biology* 138 (1997), Juli, Nr. 1, S. 131–142
- [Semrock 2011a] SEMROCK, I.: 405/488/561 nm Yokogawa dichroic beamsplitter Part Number: Di01-T405/488/561-13x15x0.5. 2011. – URL

- <http://www.semrock.com/FilterDetails.aspx?id=Di01-T405/488/561-13x15x0.5>. –
Zugriffsdatum: 02.08.2011
- [Semrock 2011b] SEMROCK, I.: 405/488/568/647 nm Yokogawa dichroic beamsplitter Part Number: Di01-T405/488/568/647-13x15x0.5. 2011. – URL <http://www.semrock.com/FilterDetails.aspx?id=Di01-T405/488/568/647-13x15x0.5>. – Zugriffsdatum: 02.08.2011
- [Semrock 2011c] SEMROCK, I.: 438/24 nm BrightLine single-band bandpass filter Part Number: FF01-438/24-25. 2011. – URL <http://www.semrock.com/FilterDetails.aspx?id=FF01-438/24-21.8-D>. – Zugriffsdatum: 04.11.2011
- [Semrock 2011d] SEMROCK, I.: 458 nm edge BrightLine single-edge dichroic beamsplitter Part Number: FF458-Di02-25x36. 2011. – URL <http://www.semrock.com/FilterDetails.aspx?id=FF458-Di02-22x27>. – Zugriffsdatum: 05.11.2011
- [Semrock 2011e] SEMROCK, I.: 538/40 nm BrightLine single-band bandpass filter Part Number: FF01-538/40-25. 2011. – URL <http://www.semrock.com/FilterDetails.aspx?id=FF01-538/40-20-D>. – Zugriffsdatum: 04.11.2011
- [Shimamoto 1999] SHIMAMOTO, N.: One-dimensional diffusion of proteins along DNA. Its biological and chemical significance revealed by single-molecule measurements. In: *The Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Mai, Nr. 22, S. 15293–15296
- [Shimomura et al. 1962] SHIMOMURA, O. ; JOHNSON, F. H. ; SAIGA, Y.: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. In: *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59 (1962), Juni, S. 223–239
- [Shribak et al. 2002] SHRIBAK, M. ; INOUE, S. ; OLDENBOURG, R.: Polarization aberrations caused by differential transmission and phase shift in high-numerical-aperture lenses: theory, measurement, and rectification. In: *Optical Engineering* 41 (2002), Mai, Nr. 5, S. 943
- [Soumpasis 1983] SOUMPAISIS, D. M.: Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. In: *Biophysical Journal* 41 (1983), Januar, Nr. 1, S. 95–97
- [Splinter et al. 2010] SPLINTER, J. ; JAKOB, B. ; LANG, M. ; YANO, K. ; ENGELHARDT, J. ; HELL, S. W. ; CHEN, D. J. ; DURANTE, M. ; TAUCHER-SCHOLZ, G.: Biological dose estimation of UVA laser microirradiation utilizing charged particle-induced protein foci. In: *Mutagenesis* 25 (2010), Mai, Nr. 3, S. 289–297
- [Sprague und McNally 2005] SPRAGUE, B. L. ; MCNALLY, J. G.: FRAP analysis of binding: proper and fitting. In: *Trends in Cell Biology* 15 (2005), Februar, Nr. 2, S. 84–91
- [Sprague et al. 2006] SPRAGUE, B. L. ; MÜLLER, F. ; PEGO, R. L. ; BUNGAY, P. M. ; STAVREVA, D. A. ; MCNALLY, J. G.: Analysis of binding at a single spatially localized cluster of binding sites by fluorescence recovery after photobleaching. In: *Biophysical Journal* 91 (2006), August, Nr. 4, S. 1169–1191
- [Sprague et al. 2004] SPRAGUE, B. L. ; PEGO, R. L. ; STAVREVA, D. A. ; MCNALLY, J. G.: Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. In: *Biophysical Journal* 86 (2004), Juni, Nr. 6, S. 3473–3495

- [Spycher et al. 2008] SPYCHER, C. ; MILLER, E. S. ; TOWNSEND, K. ; PAVIC, L. ; MORRICE, N. A. ; JANSČAK, P. ; STEWART, G. S. ; STUCKI, M.: Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. In: *The Journal of Cell Biology* 181 (2008), April, Nr. 2, S. 227–240
- [Squire et al. 2004] SQUIRE, A. ; VERVEER, P. J. ; ROCKS, O. ; BASTIAENS, P. I. H.: Red-edge anisotropy microscopy enables dynamic imaging of homo-FRET between green fluorescent proteins in cells. In: *Journal of Structural Biology* 147 (2004), Juli, Nr. 1, S. 62–69
- [Stehfest 1970] STEHFEST, H.: Algorithm 368: Numerical inversion of Laplace transforms [D5]. In: *Commun. ACM* 13 (1970), Januar, Nr. 1, S. 47–49
- [Sternheimer et al. 1982] STERNHEIMER, R. M. ; SELTZER, S. M. ; BERGER, M. J.: Density effect for the ionization loss of charged particles in various substances. In: *Physical Review B* 26 (1982), Dezember, Nr. 11, S. 6067–6076
- [Stewart 2009] STEWART, G. S.: Solving the RIDDLE of 53BP1 recruitment to sites of damage. In: *Cell Cycle* 8 (2009), Mai, Nr. 10, S. 1532–1538
- [Stewart et al. 2003] STEWART, G. S. ; WANG, B. ; BIGNELL, C. R. ; TAYLOR, A. M. R. ; ELLEDGE, S. J.: MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. In: *Nature* 421 (2003), Februar, Nr. 6926, S. 961–966
- [Stracker und Petrini 2011] STRACKER, T. H. ; PETRINI, J. H. J.: The MRE11 complex: starting from the ends. In: *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (2011), Februar, Nr. 2, S. 90–103
- [Stucki und Jackson 2006] STUCKI, M. ; JACKSON, S. P.: gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. In: *DNA Repair* 5 (2006), Mai, Nr. 5, S. 534–543
- [Sun et al. 2009] SUN, Y. ; JIANG, X. ; XU, Y. ; AYRAPETOV, M. K. ; MOREAU, L. A. ; WHETSTINE, J. R. ; PRICE, B. D.: Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. In: *Nature Cell Biology* 11 (2009), November, Nr. 11, S. 1376–1382
- [Sun et al. 2011] SUN, Y. ; WALLRABE, H. ; SEO, S. ; PERIASAMY, A.: FRET microscopy in 2010: the legacy of Theodor Förster on the 100th anniversary of his birth. In: *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* 12 (2011), Februar, Nr. 3, S. 462–474
- [Swaminathan et al. 1997] SWAMINATHAN, R. ; HOANG, C. P. ; VERKMAN, A. S.: Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. In: *Biophysical Journal* 72 (1997), April, Nr. 4, S. 1900–1907
- [Szöllosi et al. 2006] SZÖLLOSI, J. ; DAMJANOVICH, S. ; NAGY, P. ; VEREB, G. ; MÁTYUS, L.: Principles of resonance energy transfer. In: *Current Protocols in Cytometry* 1 (2006), November, Nr. 1.12., S. 1.12.1–1.12.6
- [Taucher-Scholz und Jakob 2007] TAUCHER-SCHOLZ, G. ; JAKOB, B.: *Genome Integrity*. Bd. 1. Kap. Ion Irradiation as a Tool to Reveal the Spatiotemporal Dynamics of DNA Damage Response Processes, S. 453–78, Springer, 2007
- [Terry et al. 1995] TERRY, B. R. ; MATTHEWS, E. K. ; HASELOFF, J.: Molecular character-

- risation of recombinant green fluorescent protein by fluorescence correlation microscopy. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 217 (1995), Dezember, Nr. 1, S. 21–27
- [Thorlabs 2011] THORLABS: *Polarizing Beamsplitter Cubes*. 2011. – URL <http://www.thorlabs.de/catalogpages/v20/725.pdf>. – Zugriffsdatum: 02.11.2011
- [Thévenaz et al. 1998] THÉVENAZ, P. ; RUTTIMANN, U. E. ; UNSER, M.: A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. In: *IEEE Transactions on Image Processing: A Publication of the IEEE Signal Processing Society* 7 (1998), Nr. 1, S. 27–41
- [Tobias et al. 2010] TOBIAS, F. ; DURANTE, M. ; TAUCHER-SCHOLZ, G. ; JAKOB, B.: Spatio-temporal analysis of DNA repair using charged particle radiation. In: *Mutation Research* 704 (2010), Juni, Nr. 1-3, S. 54–60
- [Tramier et al. 2000] TRAMIER, M. ; KEMNITZ, K. ; DURIEUX, C. ; COPPEY, J. ; DENJEAN, P. ; PANSU, R. B. ; COPPEY-MOISAN, M.: Restrained torsional dynamics of nuclear DNA in living proliferative mammalian cells. In: *Biophysical Journal* 78 (2000), Mai, Nr. 5, S. 2614–2627
- [Tramier et al. 2006] TRAMIER, M. ; ZAHID, M. ; MEVEL, J. ; MASSE, M. ; COPPEY-MOISAN, M.: Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells. In: *Microscopy Research and Technique* 69 (2006), November, Nr. 11, S. 933–939
- [Trujillo et al. 1998] TRUJILLO, K. M. ; YUAN, S. S. ; LEE, E. Y. ; SUNG, P.: Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. In: *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), August, Nr. 34, S. 21447–21450
- [Trujillo et al. 2003] TRUJILLO, K. M. ; ROH, D. H. ; CHEN, L. ; VAN KOMEN, S. ; TOMKINSON, A. ; SUNG, P.: Yeast xrs2 binds DNA and helps target rad50 and mre11 to DNA ends. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Dezember, Nr. 49, S. 48957–48964
- [Tsibidis 2009] TSIBIDIS, G. D.: Quantitative interpretation of binding reactions of rapidly diffusing species using fluorescence recovery after photobleaching. In: *Journal of Microscopy* 233 (2009), März, Nr. 3, S. 384–390
- [Tsien 1998] TSIEN, R. Y.: The green fluorescent protein. In: *Annual Review of Biochemistry* 67 (1998), S. 509–544
- [Tsien-Laboratory 2011] TSIEN-LABORATORY: *GFP und Cherry Spektrum*. 2011. – URL <http://www.tsienlab.ucsd.edu/Documents/REF%20-%20Fluorophore%20Spectra.xls>. – Zugriffsdatum: 02.11.2011
- [Unsal-Kaçmaz et al. 2002] UNSAL-KAÇMAZ, K. ; MAKHOV, A. M. ; GRIFFITH, J. D. ; SANCAR, A.: Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2002), Mai, Nr. 10, S. 6673–6678
- [Uziel et al. 2003] UZIEL, T. ; LERENTHAL, Y. ; MOYAL, L. ; ANDEGEKO, Y. ; MITTELMAN, L. ; SHILOH, Y.: Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. In: *The EMBO Journal* 22 (2003), Oktober, Nr. 20, S. 5612–5621
- [Virgilio et al. 2009] VIRGILIO, M. D. ; YING, C. Y. ; GAUTIER, J.: PIKK-dependent phosphorylation of Mre11 induces MRN complex inactivation by disassembly from chromatin. In: *DNA Repair* 8 (2009), November, Nr. 11, S. 1311–1320
- [Voss et al. 2008] VOSS, K. O. ; FOURNIER, C. ; TAUCHER-SCHOLZ, G. ; VOSS, K. O. ; FOUR-

- NIER, C. ; TAUCHER-SCHOLZ, G.: Heavy ion microprobes: a unique tool for bystander research and other radiobiological applications. In: *New Journal of Physics* 10 (2008), Juli, Nr. 7, S. 075011
- [Wachsmuth et al. 2000] WACHSMUTH, M. ; WALDECK, W. ; LANGOWSKI, J.: Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy. In: *Journal of Molecular Biology* 298 (2000), Mai, Nr. 4, S. 677–689
- [Wang et al. 2011] WANG, J. ; GONG, Z. ; CHEN, J.: MDC1 collaborates with TopBP1 in DNA replication checkpoint control. In: *The Journal of Cell Biology* 193 (2011), April, Nr. 2, S. 267–273
- [Watanabe et al. 2009] WATANABE, K. ; IWABUCHI, K. ; SUN, J. ; TSUJI, Y. ; TANI, T. ; TOKUNAGA, K. ; DATE, T. ; HASHIMOTO, M. ; YAMAIZUMI, M. ; TATEISHI, S.: RAD18 promotes DNA double-strand break repair during G1 phase through chromatin retention of 53BP1. In: *Nucleic Acids Research* 37 (2009), April, Nr. 7, S. 2176–2193
- [Weber 1954] WEBER, G.: Dependence of the polarization of the fluorescence on the concentration. In: *Transactions of the Faraday Society* 50 (1954), S. 552
- [Weiss et al. 2004] WEISS, M. ; ELSNER, M. ; KARTBERG, F. ; NILSSON, T.: Anomalous subdiffusion is a measure for cytoplasmic crowding in living cells. In: *Biophysical Journal* 87 (2004), November, Nr. 5, S. 3518–3524
- [Weyrather und Kraft 2004] WEYRATHER, W. K. ; KRAFT, G.: RBE of carbon ions: experimental data and the strategy of RBE calculation for treatment planning. In: *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 73 (2004), Dezember, Nr. Suppl 2, S. 161–169
- [Williams et al. 2010] WILLIAMS, G. J. ; LEES-MILLER, S. P. ; TAINER, J. A.: Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. In: *DNA Repair* 9 (2010), Dezember, Nr. 12, S. 1299–1306
- [Williams et al. 2009] WILLIAMS, R. S. ; DODSON, G. E. ; LIMBO, O. ; YAMADA, Y. ; WILLIAMS, J. S. ; GUENTHER, G. ; CLASSEN, S. ; GLOVER, J. N. M. ; IWASAKI, H. ; RUSSELL, P. ; TAINER, J. A.: Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. In: *Cell* 139 (2009), Oktober, Nr. 1, S. 87–99
- [Williams et al. 2007] WILLIAMS, R. S. ; WILLIAMS, J. S. ; TAINER, J. A.: Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. In: *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 85 (2007), August, Nr. 4, S. 509–520
- [Wilson und Juskaitis 1995] WILSON, T. ; JUSKAITIS, R.: On the extinction coefficient in confocal polarization microscopy. In: *Journal of Microscopy* 179 (1995), September, Nr. 3, S. 238–240
- [Wold 1997] WOLD, M. S.: Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. In: *Annual Review of Biochemistry* 66 (1997), S. 61–92
- [Wold und Kelly 1988] WOLD, M. S. ; KELLY, T.: Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. In:

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (1988), April, Nr. 8, S. 2523–2527
- [Wu et al. 2008] WU, L. ; LUO, K. ; LOU, Z. ; CHEN, J.: MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2008), August, Nr. 32, S. 11200–11205
- [Yokoe und Meyer 1996] YOKOE, H. ; MEYER, T.: Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement. In: *Nature Biotechnology* 14 (1996), Oktober, Nr. 10, S. 1252–1256
- [Zgheib et al. 2009] ZGHEIB, O. ; PATAKY, K. ; BRUGGER, J. ; HALAZONETIS, T. D.: An oligomerized 53BP1 tudor domain suffices for recognition of DNA double-strand breaks. In: *Molecular and Cellular Biology* 29 (2009), Februar, Nr. 4, S. 1050–1058
- [Zou und Elledge 2003] ZOU, L. ; ELLEDGE, S. J.: Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. In: *Science* 300 (2003), Juni, Nr. 5625, S. 1542–1548

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Frank Tobias
Geburtsdatum: 29.02.1984
Geburtsort: Aschaffenburg

Schule und Studium

Seit Juni 2010	Mitglied der "Helmholtz Graduate School for Hadron and Ion Research, HGS-HIRe for FAIR"
Seit Sept. 2008	Promotion an der TU Darmstadt Fachbereich Physik unter Anleitung von Prof. Marco Durante, Ph.D.; durchgeführt am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Darmstadt, Abteilung Biophysik
September 2008	Diplom in Biophysik an der TU Kaiserslautern Fachbereich Physik
Dez. 2007 bis Sept. 2008	Diplomand an der TU Kaiserslautern Fachbereich Physik unter Anleitung von Prof. Dr. Volker Schünemann und Dr. Gisela Taucher-Scholz; durchgeführt am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Darmstadt, Abteilung Biophysik
Sept. 2006 bis Feb. 2007	Auslandssemester an der University of Strathclyde, Glasgow, UK
Okt. 2003 bis Sept. 2008	Studium der Biophysik an der TU Kaiserslautern
Juni 2003	Allgemeine Hochschulreife
Sept. 1994 bis Juni 2003	Friedrich-Dessauer-Gymnasium in Aschaffenburg

Auszeichnungen

Juni/Juli 2010	Ausgewählter Teilnehmer für "The Nobel Laureates Meeting at Lindau" in Lindau
Mai/Juni 2009	Ausgewählter Teilnehmer für die "NASA space radiation summer school" am Brookhaven National Laboratory in Upton, New York, USA
Oktober 2008	Reisestipendium zur Tagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung in Tübingen

Veröffentlichungen und Berichte

- Kozlov, S. V. ; Graham, M. E. ; Jakob, B. ; Tobias, F. ; Kijas, A. W. ; Tanuji, M. ; Chen, P. ; Robinson, P. J. ; Taucher-Scholz, G. ; Suzuki, K. ; So, S. ; Chen, D. ; Lavin, M. F.: Autophosphorylation and ATM Activation: Additional sites add to the complexity. In: The Journal of Biological Chemistry 286 (2011), März, Nr. 11, S. 9107-9119
- Tobias, F. ; Durante, M. ; Taucher-Scholz, G. ; Jakob, B.: Spatiotemporal analysis of DNA repair using charged particle radiation. In: Mutation Research 704 (2010), Juni, Nr. 1-3, S. 54-60
- Tobias, F. ; Khan, R. ; Leifke, A. L. ; Durante, M. ; Jakob, B. ; Taucher-Scholz, G.: Design and validation of a microscopic Förster Resonance Energy Transfer setup to measure protein interactions. In: GSI Scientific Report 2010 (2011)
- Tobias, F. ; Becherel, O. ; Lavin, M. ; Becker, G. ; Durante, M. ; Taucher-Scholz, G. ; Jakob, B.: Requirement for PARP-1 in the recruitment of aprataxin to sites of DNA breaks. In: GSI Scientific Report 2009 (2010)
- Tobias, F. ; Leifke, A. L. ; Becker, G. ; Durante, M. ; Jakob, B. ; Taucher-Scholz, G.: A new experimental setup allows studying protein turnover at DNA damage sites. In: GSI Scientific Report 2008 (2009)

Konferenzbeiträge

- Tobias, F. ; Khan, R. ; Durante, M. ; Jakob, B. ; Taucher-Scholz, G.: Design and validation of a new confocal FRET polarization anisotropy microscope. In: Focus on Microscopy Conference (2011) Posterpräsentation
- Tobias, F. ; Durante, M. ; Taucher-Scholz, G. ; Jakob, B.: Fast dynamic behaviour of the repair protein NBS1 after the induction of localized DNA damage in human cells. In: EMBO Workshop, Advanced Light Microscopy Techniques and Their Applications - 10th International ELMI Meeting (2010) Posterpräsentation
- Tobias, F. ; Durante, M. ; Jakob, B. ; Taucher-Scholz, G.: Bindungsverhalten von NBS1 an lokalisierten DNA-Schadstellen. In: Tagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (2010) Posterpräsentation
- Tobias, F. ; Splinter, J. ; Jakob, B. ; Taucher-Scholz, G.: Binding dynamics of repair proteins at DNA damage sites after charged particle irradiation. In: Tagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (2009) Posterpräsentation
- Tobias, F. ; Splinter, J. ; Jakob, B. ; Taucher-Scholz, G.: Recruitment and exchange of NBS1 at DNA damage sites. In: Tagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (2008) Posterpräsentation

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei folgenden Personen ganz herzlich bedanken:

Herrn Prof. Marco Durante, Ph.D., für seine Zustimmung meine Promotion unter seiner Leitung an der TU Darmstadt durchführen zu dürfen und für die Möglichkeit dieses interessante Projekt an der GSI bearbeiten zu können.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Gerhard Kraft, der es mir schon als Diplomand ermöglichte meine Arbeit in seiner Gruppe zu beginnen und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Prof. Dr. Barbara Drossel und Herrn Prof. Dr. Thomas Halfmann für die Bereitschaft als Prüfer zu fungieren.

Frau Dr. Gisela Taucher-Scholz für ihr Engagement und ihre besondere Unterstützung, wodurch mir vieles ermöglicht wurde, wofür ich sehr dankbar bin.

Herrn Dr. Burkhard Jakob für die umfangreiche Betreuung und unerschöpfliche Hilfsbereitschaft während meiner gesamten Zeit an der GSI. Durch die freundschaftliche Zusammenarbeit herrschte immer eine sehr herzliche Arbeitsatmosphäre.

Frau Prof. Dr. Barbara Drossel, Herrn Daniel Löb und Herrn Roman Nicor Lengert für die zahlreichen und effektiven Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Sergei Kozlov, Ph.D. für die Bereitstellung von zahlreichen Plasmiden, die für den Erfolg dieser Arbeit von großer Bedeutung waren.

Rayees Khan für die Unterstützung bei der Planung und Zeichnung aller technischen Aufbauten sowie für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Gudrun Becker und Anna Lena Leifke für die Unterstützung bei allen Zellkulturarbeiten.

Dr. Kay-Obbe Voss und Bruno Merk für die Hilfe bei allen Microbeamexperimenten.

Allen, die die Arbeit Korrektur gelesen haben.

Allen treuen Mitgliedern des 11:30 Uhr Vereins und der unterhaltsamen Kaffeepausenfraktion, besonders Wolfgang und Burkhard.

Der gesamten Arbeitsgruppe Biophysik und vor allem allen Kollegen/innen der DNA-Gruppe.

Abschließend möchte ich mich besonders bei meiner Freundin für die moralische Unterstützung, insbesondere in den letzten Monaten der Arbeit, ganz herzlich bedanken. Ein spezieller Dank gilt meiner Familie und meinen Eltern. Ich konnte immer auf ihre Unterstützung bauen.

Diese Arbeit wurde durch die BMBF Ausbildungsförderung 02NUK001A unterstützt.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erstellt zu haben. Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Darmstadt, 21. November 2011

Unterschrift